

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Endotheliale Progenitorzellen: Immunogenität zirkulierender
CD34⁺ Zellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Riesinger

aus Burghausen

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med Heiko Methe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Weis
PD Dr. med. Heike Beck
Prof. Dr. med. Stefan Brunner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2017

1. Einleitung	6
Koronare Herzkrankheit	6
Klinische Definition	7
Pathogenese der Atherosklerose	10
„Response-To-Injury“-Theorie	10
Endothelzellen als Immunzellen	14
Endotheliale Progenitorzellen	16
Definition und Bedeutung endothelialer Progenitorzellen	16
Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen	17
Klinische Relevanz	19
Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark	20
2. Arbeitshypothese und Fragestellung	22
3. Material und Methoden	24
Studienpopulation	24
Blutentnahme und -aufbereitung	26
Materialien	27
Isolation von CD34 ⁺ Zellen	28
Immunfluoreszenzfärbung	29
RNA-Isolation aus isolierten CD34 ⁺ Zellen	29
cDNA-Synthese	30
Real Time PCR	30
ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	33
Statistische Auswertung	34

4. Ergebnisse	35
Charakterisierung des Patientenkollektivs	35
Immunfluoreszenzmikroskopie	38
Ergebnisse der Real Time PCR	39
Expression von Oberflächenmolekülen auf CD34 ⁺ Zellen	39
ICAM-1	39
VCAM-1	44
CD80	48
CD86	50
HLA-DR	52
Serumkonzentrationen von TNF α im Vergleich	53
Vergleich des Ausmaß der Hochregulation der Expression von ICAM- und VCAM-RNA in unstimulierten CD34 ⁺ Zellen im Vergleich zur Serumkonzentration von TNF α	54
Vergleich der mRNA Expression von Oberflächenmolekülen in CD34 ⁺ Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme	56
ICAM-1	56
VCAM-1	60
CD80	64
CD86	65
5. Diskussion	66
6. Zusammenfassung	78
Bibliografie	80

1. Einleitung

Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Sie stellt seit vielen Jahren die häufigste Todesursache in den Industrienationen dar. Auch wenn die Zahlen in den letzten Jahren durch verbesserte interventionelle und medikamentöse Behandlungsmethoden und Präventionsprogramme rückläufig sind, sind die verschiedenen Manifestationen der KHK, wie die chronisch ischämische Herzerkrankung mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz, der akute Myokardinfarkt und ischämisch getriggerte Rhythmusstörungen die drei häufigsten Ursachen für Sterbefälle in Deutschland [1],(Gesundheitsberichterstattung des Bundes; www.gbe-bund.de).

Klinische Definition

Die klinische Einteilung der KHK erfolgt durch die gemeinsame Betrachtung von Befunden invasiver und nicht-invasiver Untersuchungen, der Klinik des Patienten, EKG-Diagnostik und der Höhe der im Blut gemessenen myokardialen Destruktionsmarker (u.a. Troponine, Kreatin-Kinase, Myoglobin). Vom klinischen Aspekt her unterscheidet man zwischen stabiler KHK und dem akuten Koronarsyndrom (ACS).

Das Leitsymptom der stabilen KHK ist die stabile Angina pectoris (AP; Angina Pectoris= lat. „Brustenge“). Dabei handelt es sich um typische, reproduzierbare und belastungsabhängige Schmerzen, welche unter Ruhe oder Einnahme von gefäßerweiternden Präparaten (z.B. Nitroglyzerin) sistieren. Die typische Symptomatik ist der retrosternale Brustschmerz, welcher häufig in den linken Arm, Nacken, Hals und den Unterkiefer ausstrahlt. Begleitet wird die Schmerzsymptomatik häufig durch vegetative Symptome wie Luftnot, Schweißausbrüche und Übelkeit.

Unter dem Begriff des akuten Koronarsyndroms werden alle unmittelbar lebensbedrohlichen Formen der KHK zusammengefasst. Er umfasst hierbei drei Entitäten: Den ST-Hebungs-Infarkt (STEMI), den nicht ST-Hebungs-Infarkt (NSTEMI) und die instabile AP.

Der ST-Hebungs-Infarkt ist definiert durch eine ST-Strecken-Hebung von $\geq 0,1\text{mV}$ in mindestens zwei zusammenhängenden Extremitätenableitungen im EKG ohne begleitende Q-Zacke oder eine ST-Strecken-Hebung von $\geq 0,2\text{mV}$ in mindestens zwei zusammenhängenden Brustwandableitungen. Da die Symptomatik, vor allem bei Frauen und Diabetikern, auch atypisch sein kann, steht sie bei der Diagnose des STEMI nicht im Vordergrund [2]. Der mit der ST-Hebung einhergehende myokardiale Schaden geht mit einer Freisetzung myokardspezifischer Labormarker einher (u.a. Troponine, Kreatinin-Kinase, Myoglobin).

Bei einer Erhöhung des Troponins (I oder T) ohne ST-Hebungen im Oberflächen-EKG spricht man von einem NSTEMI [3].

Jede erstauftretene Angina ist definiert als instabile AP. Weitere Formen der instabilen AP sind durch zunehmende Schwere, Dauer, Häufigkeit der Schmerzanfälle, Ruheangina oder einen zunehmenden Bedarf an antianginösen Medikamenten charakterisiert.

Für das therapeutische Vorgehen bei akutem Koronarsyndrom gibt es Leitlinien der deutschen und internationalen Gesellschaften für Kardiologie [4, 5]. Kurz gefasst ist bei einer im EKG nachgewiesenen ST-Strecken-Hebung die sofortige Reperfusion mittels PTCA (perkutane transluminale Koronarangioplastie), im Ausnahmefall mittels systemischer pharmakologischer Lysetherapie, anzustreben. Wenn keine ST-Strecken-Hebung sichtbar ist, aber mindestens ein Risikofaktor wie erhöhtes Troponin (NSTEMI), ST-Strecken-Senkungen $\geq 0,1\text{mV}$, hämodynamische Instabilität, Rhythmusinstabilität, refraktäre Angina oder Diabetes mellitus vorhanden ist, wird ebenfalls eine invasive Herzkatheterdiagnostik mit eventueller Intervention empfohlen. Ist keines dieser Risikomerkmale vorhanden, steht primär die konservative Therapie und Überwachung der Troponin-Werte sowie das kontinuierliche Monitoring des Ruhe-EKGs im Vordergrund. Als medikamentöse Therapie wird für alle akuten Koronarsynndrome eine Versorgung mit Acetylsalicylsäure und P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten, in der Regel Heparin und unter Beachtung der Kontraindikationen Betablocker, Nitroglycerin und bei starken Schmerzen Morphin empfohlen.

Alle Postinfarktpatienten sollten als Prophylaxe für nachfolgende Reinfarkte und andere Komplikationen der Atherosklerose in anderen Gefäßgebieten (z.B. ischämische Hirninfarkte, periphere arterielle Verschlusskrankheit) mit Betablockern, ACE-Hemmern, Thrombozytenaggregationshemmern (ASS, bei Kontraindikation oder nach Intervention auch zeitlich begrenzt P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten) und Cholesterinsenkern (bevorzugt HMG-CoA-Antagonisten, sogenannte Statine) als Dauermedikation versorgt werden. Zudem sollte ein Nikotinkonsum eingestellt und ein Diabetes mellitus diätetisch, ggf. auch medikamentös behandelt werden [2, 3]. Darüber hinaus sollten

Endotheliale Progenitorzellen: Immunogenität zirkulierender CD34⁺Zellen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Lebensstilveränderungen vorgenommen werden (mediterrane Diät, regelmäßige Bewegung, Stressreduktion).

Pathogenese der Atherosklerose

Es ist inzwischen weitläufig akzeptiert, dass die atherosklerotischen Gefäßveränderungen Ausdruck eines chronischen Entzündungsgeschehens in der Gefäßwand sind [6]. Dabei spielt die durch kardiovaskuläre Risikofaktoren bedingte endotheliale Dysfunktion eine herausragende Rolle in der Pathogenese. Dysfunktionales Endothel zeichnet sich durch eine regulatorische Imbalance mit inflammatorischer Aktivierung und Expression von Adhäsions- und kostimulatorischen Molekülen, sowie Sekretion von Chemokinen aus [7]. Es konnte des weiteren gezeigt werden, dass antiendotheliale Antikörper, welche bei KHK [8] oder auch bei alleinigem Vorhandensein kardiovaskulärer Risikofaktoren [9, 10] im Blut zirkulieren, zur Aktivierung der Endothelzellen führen. Jedes Stadium der KHK ist durch ein unterschiedliches Niveau der systemischen Entzündungsaktivität gekennzeichnet. Letztlich bedingt das Aufreißen der endothelialen Schicht, die so genannte Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombozytenaktivierung über den thrombotischen Verschluss des betroffenen Gefäßes die Entstehung eines ST-Hebungsinfarktes.

„Response-To-Injury“-Theorie

Die Arbeitsgruppe um Russel Ross begann schon Anfang der 80er Jahre die Atherosklerose als inflammatorische Erkrankung anzusehen und entwickelte die „response-to-injury“-Theorie, welche auch heute noch als pathophysiologische Grundlage für die Erklärung der Atherosklerose dient. Die Einteilung der Atherosklerose nach Ross erfolgt in vier Stadien:

- 1) Endotheliale Dysfunktion
- 2) Bildung von „fatty streaks“
- 3) Stabile Plaque
- 4) Instabile Plaque und Plaqueruptur

Am Anfang der Erkrankung steht die endotheliale Dysfunktion. Als mögliche Ursachen für die endotheliale Dysfunktion und die damit einhergehende erhöhte Permeabilität des Endothels werden Schädigungen des Endothels durch erhöhtes und modifiziertes LDL, freie Sauerstoffradikale (induziert durch Hypertonus, Nikotinabusus und Diabetes mellitus), genetische Einflüsse, erhöhte Homocysteinlevel, sowie Infektionen mit Mikroorganismen wie Herpes-Viren oder Chlamydia pneumoniae genannt. [11]

Die erhöhte Gefäßwandpermeabilität führt zur Migration von Leukozyten und Makrophagen in die Gefäßwand mit dortiger Initiierung einer chronischen Entzündungsreaktion. Bei der Rekrutierung dieser Zellen scheint VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), als endotheliales Oberflächenmolekül, eine wichtige Rolle zu spielen [6]. Des Weiteren erfolgt eine Immigration von glatten Muskelzellen, T-Zellen und Mastzellen. Die Ablagerungen in der Gefäßwand imponieren von da an als makroskopisch sichtbare, gelbliche Veränderungen, welche in diesem Stadium noch keine Lumenobstruktion bewirken. Sie werden „fatty streaks“ genannt und repräsentieren klassischerweise das zweite Stadium der „response-to-injury“-Theorie nach Ross. „Fatty streaks“ können sogar schon im Kindesalter nachgewiesen werden [12].

Das nächste Stadium ist durch eine „komplizierte“, aber stabile Plaque mit zentraler Nekrose und fibröser Kappe gekennzeichnet. Das sogenannte „remodeling“ der Plaque erfolgt durch eine weitere Akkumulation und Anreicherung glatter Muskelzellen und extrazellulärer Matrix (Kollagen, elastische Fasern, Proteoglykane). Diese Schicht bildet die fibröse Kappe, welche makroskopisch als weißliche, lumeneinengende Struktur erscheint. Unter dieser Schicht befindet sich der zellreiche Plaqueanteil, welcher lipidbeladene Makrophagen (Schaumzellen), Leukozyten und glatte Muskelzellen beinhaltet. Mit zunehmendem Wachstum der komplizierten Plaque kann sich unter der zellreichen Schicht ein nekrotischer Kern mit abgestorbenen Zellen, kristallinem Cholesterin und zentraler Kalzifizierung bilden.

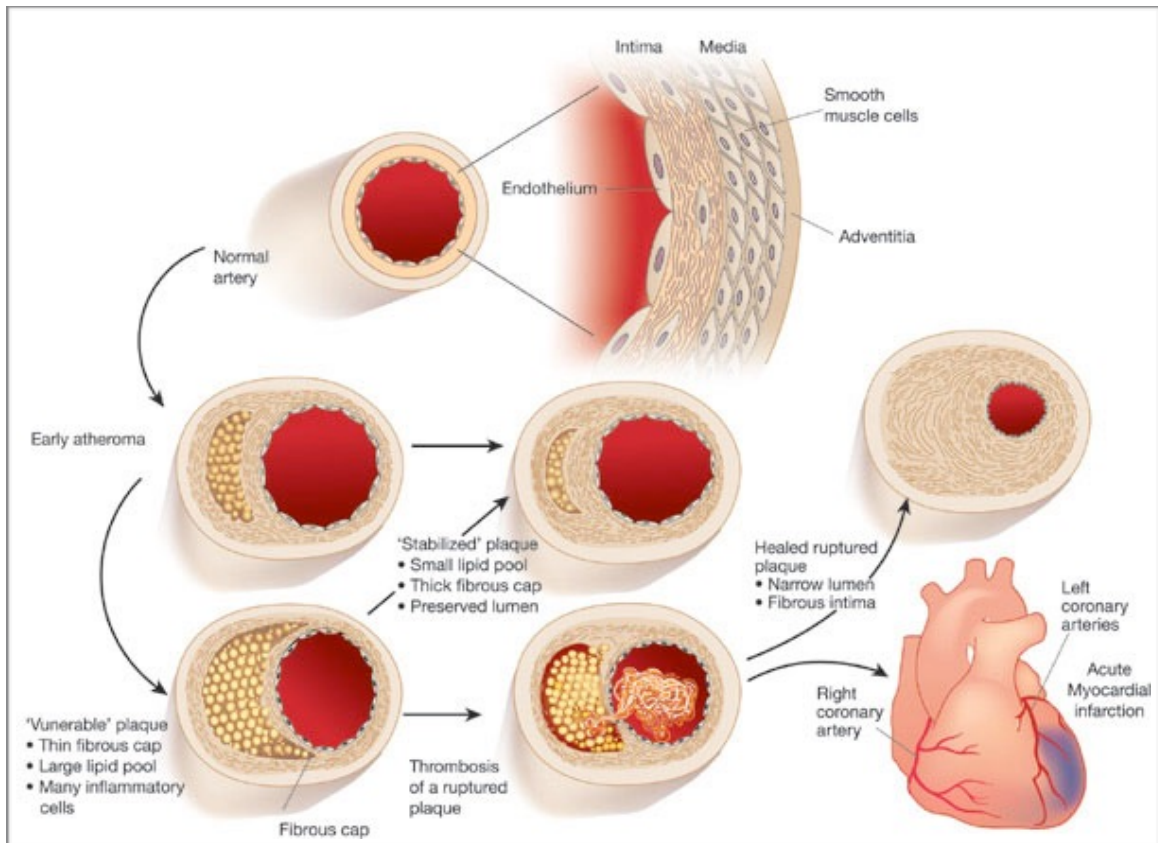


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Evolution eines atherosklerotischen Plaques [13]

Das letzte Stadium der „response-to-injury“-Theorie ist die instabile Plaque. Die instabile Plaque besitzt eine vulnerable, instabile, fibröse Kappe, was sowohl auf die zunehmende Nekrotisierung des Kerns und Degeneration der Extrazellulärmatrix, als auch auf die Kalzifizierung und Neovaskularisierung innerhalb der Plaque zurückgeführt werden kann. Diese und weitere Faktoren, wie zunehmende Scherkräfte durch Obstruktion des Lumens, können eine Plaqueruptur provozieren bzw. induzieren. Die Plaqueruptur erfolgt typischerweise an der schwächsten Stelle der Plaque, der sogenannten „Schulter“, wo Makrophagen eintreten und aktiviert werden. Die Ruptur der wandständigen Plaque hat die Bildung eines thrombozytenreichen Thrombus im Gefäßlumen zur Folge. Die Förderung der Thrombozytenadhäsion erfolgt durch die Freilegung diverser Gefäßwandbestandteile wie zum Beispiel Kollagen, von Willebrand-Faktor und Lipide [14-16].

Die Plaqueruptur repräsentiert das klinische Symptom des akuten Koronarsyndroms (ACS). Das klinische Bild nach Ruptur einer Plaque kann sich, abhängig von der Größe, der Lokalisation und der Dauer des durch die Thrombusformation hervorgerufenen Verschlusses, sehr vielfältig darstellen. Von unauffällig, über transiente, episodische Schmerzen wie bei der instabilen AP bis hin zum akuten Myokardinfarkt durch abrupte Reduktion oder abrupten Abbruch der koronaren Blutversorgung, sind alle Nuancen denkbar. Ein manifester ST-Hebungsinfarkt entwickelt sich aus einer persistierenden Gefäßokklusion.

Es muss einschränkend darauf hingewiesen werden, dass es sich bei der hier vorliegenden Theorie um eine studienhafte Beschreibung mit Modellcharakter handelt. Nicht jede atherosklerotische Plaque durchläuft alle Stadien und führt somit konsekutiv zum akuten Myokardinfarkt. Vielmehr existieren mehrere Plaques bei einer Person in verschiedenen Stadien gleichzeitig, wovon manche das letzte Stadium erreichen mögen, die meisten jedoch in einem anderen Stadium sistieren oder sich gelegentlich sogar zurückbilden. Auch die Annahme jeder Myokardinfarkt sei auf eine Plaqueruptur zurückzuführen ist falsch, da es, auch wenn die Plaqueruptur sicher die häufigste Ursache darstellt, noch andere Gründe für die Sauerstoffminderversorgung und damit das Entstehen eines Myokardinfarktes gibt (z.B. Vasospasmen bei der sogenannten Prinzmetal-Angina oder Koronarembolien bei Vorhofflimmern).

Endothelzellen als Immunzellen

Die klassische Immunreaktion erfordert die Präsentation eines Antigens durch antigen-präsentierende-Zellen (APC = Antigen Presenting Cells) an Zellen der Effektorantwort (z.B. CD4⁺-T-Zellen). Bei APC handelt es sich zum Beispiel um Makrophagen, dendritische Zellen und aktivierte B-Lymphozyten. APC präsentieren bei Kontakt mit körperfremden Molekülen das Antigen gemeinsam mit HLA-Molekülen der Klasse II. Die gleichzeitige Expression von sogenannten kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80, CD86) durch APC mit Bindung an den spezifischen Rezeptor auf der Effektorzelle ist zwingende Voraussetzung für eine effektive Aktivierung von immunologischen Effektorzellen mit dann zielgerichteter Zerstörung des Antigens. Der Kontakt zwischen APC und T-Lymphozyt kann durch Expression von Adhäsionsmolekülen wie zum Beispiel ICAM (= intracellular adhesion molecule)-1 noch zusätzlich gesteigert werden. Auch Endothelzellen können als sogenannte semi-professionelle APC eine Immunantwort initiieren. Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen Antigene über MHC-I- und MHC-II-Moleküle präsentieren und im Zusammenspiel mit Expression von kostimulatorischen Molekülen Effektor-T-Lymphozyten aktivieren können [17]. Außerdem exprimieren Endothelzellen in weiten Anteilen des Gefäßbaumes unter Zytokin-Stimulation (z.B. TNF α , IFN γ) die proinflammatorischen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (=vascular cell adhesion molecule), welche an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind [18]. Somit sind Endothelzellen fähig, eine Immunantwort in der Gefäßwand zu initiieren und zu unterhalten [17].

Schon 1993 wurde von der Arbeitsgruppe um Li et al. anhand eines Hasenmodells gezeigt, dass Endothelzellen unter fettreicher Diät vermehrt VCAM-1 exprimieren. Die verstärkte Expression von VCAM-1 im Endothel trat vor den ersten atherosklerotischen Läsionen auf, wohingegen bei Hasen, die mit einer normokalorischen Diät gefüttert wurden, VCAM-1 nicht exprimiert wurde. In vitro konnten sie des Weiteren zeigen, dass IL1 α , TNF α , IL-4,

Interferon-gamma und gramnegative bakterielle Polysaccharide die VCAM-1-Expression auf dem Endothel zusätzlich zu dem atherogenen Lipid-Milieu induzieren konnten [19].

Im Rattenmodell unter cholesterinreicher Diät zeigte sich eine nicht nur auf das Endothel begrenzte ICAM-1-Expression, sondern eine im betroffenen Gefäßsegment in allen Wandabschnitten (Intima, Media, Adventitia) ubiquitär nachweisbare ICAM-1-Expression. Wenn die fettreiche Nahrung beendet und wieder auf eine normale Diät umgestellt wurde, sank die ICAM-1-Expression bereits nach vier Wochen wieder signifikant ab [20].

Auch bei arteriosklerotischen Plaques in humanen Koronargefäßen konnte eine erhöhte endotheliale Expression von ICAM-1 und VCAM-1 nachgewiesen werden [21]. Khan et al. zeigten, dass VCAM-1 in humanen aortalen Endothelzellen nach Inkubation mit oxidiertem LDL TNF α -abhängig verstärkt exprimiert wird [22].

Dies alles legt nahe, dass Endothelzellen über die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 an der Migration von im Blut zirkulierenden T-Zellen und Makrophagen in die Gefäßwand beteiligt sein könnten.

Endotheliale Progenitorzellen

Seit Asahara et al. im Jahr 1997 einen Artikel über endotheliale Progenitorzellen (=EPC) und deren Potenzial in Endothelzellen zu differenzieren, publizierten, stieg das Interesse an eben diesen Zellen sprunghaft an.

Definition und Bedeutung endothelialer Progenitorzellen

EPC sind im peripheren Blut zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark, die in vivo und in vitro sowohl endotheliales als auch vaskulogenetisches Potenzial aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Progenitorzellen einen wichtigen Beitrag zur Vaskulogenese und der Reparatur geschädigten Endothels leisten [23-27]. In Tierversuchen konnte zuerst gezeigt werden, dass ex-vivo kultivierte EPC entscheidend an der Reperfusion bei Ischämie beteiligt sind [23, 24], mit dem Resultat eines verminderten Ischämieareals und Aussprossung neuer Kapillargefäße. Nachdem die Studien einen frappierend positiven Effekt von EPC zeigten, wurden auch Studien an Patienten durchgeführt.

Einer randomisierten, doppelblinden Studie aus dem Jahr 2011 zufolge, in welcher Patienten mit refraktärer Angina pectoris entweder autologe, aus dem Knochenmark mobilisierte, CD34⁺Zellen, oder ein Placebo in das ischämische Myokard injiziert wurde, erlitten Patienten, die mit dem Verum behandelt wurden im darauffolgenden Jahr signifikant weniger AP-Anfälle, als Patienten, die ein Placebo injiziert bekommen hatten [28]. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die injizierten CD34⁺ EPC nicht in dem betreffenden Myokardareal nachverfolgt werden konnten, so dass der pathophysiologische Hintergrund der klinischen Beobachtung unklar blieb.

Charakterisierung endothelialer Progenitorzellen

Mit der Charakterisierung der EPC haben sich viele Arbeitsgruppen beschäftigt [29]. Ein endgültiges Modell, wie man EPC charakterisieren und somit gegebenenfalls isolieren kann, ist bislang noch nicht entwickelt, es gibt jedoch viele Vorschläge.

Asahara et al., die den ersten Artikel zu diesem Themenkomplex im Jahr 1997 veröffentlichten [30], definierten EPC zuerst als CD34⁺Zellen, da CD34 sowohl auf humanen Stammzellen, als auch auf Endothelzellen zu finden ist und die im Blut zirkulierenden CD34⁺Zellen somit am wahrscheinlichsten sowohl vaskulogenetisches als auch endotheliales Potenzial aufweisen könnten [25].

Andere Arbeitsgruppen versuchten, EPC genauer zu charakterisieren indem CD34⁺Zellen über zusätzliche Expression von anderen Oberflächenmarkern definiert wurden. CD34⁺ Zellen, die gleichzeitig CD133, als Marker hämatopoetischer Stammzellen und KDR (VEGFR2, vascular endothelial growth receptor 2) als Marker vaskulärer Endothelzellen exprimieren, werden von vielen Arbeitsgruppen als potenzielle EPC angesehen [31, 32].

Ein weiteres gängiges Modell EPC ex vivo zu isolieren, ist anhand von Zellkulturen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes, die Gruppe von Zellen mit der passenden Differenzierung auszuwählen:

Dabei werden zunächst jene Zellen, welche sich in der Zellkultur adhärent zeigten isoliert und einer genaueren Analyse zugeführt. Diejenige Zellgruppe, welche acetyliertes LDL aufnimmt und Lektin bindet wird als „late-outgrowth colony-forming-units endothelial cells“ bezeichnet (diese sind in der Lage koloniebildende Einheiten mit Differenzierungspotenzial hin zu Endothelzellen zu bilden) [29, 30, 33, 34]. Dies unterscheidet sie gravierend von im Blut zirkulierenden, von der subendothelialen Gefäßmatrix losgelösten, ‚physiologischen‘ Endothelzellen.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass so isolierte EPC in verschiedenen Graden auch andere Oberflächenmoleküle exprimieren, was die Differenzierung von anderen Zellen, zum Beispiel Makrophagen, methodisch erschwert [35-37].

Ein anderer Ansatz EPC zu definieren ist, ihr Verhalten in vivo und in vitro zu untersuchen. Für Endothelzellen einmalig zu sein scheint, dass sie in einem dreidimensionalen Kultursystem aus Kollagen Röhren ausbilden [38]. Weil dieser Phänotyp endothel-spezifisch zu sein scheint, kann ein solcher Versuchsaufbau auf funktionaler Art helfen, isolierte Zellen als EPC zu identifizieren [39]. Die verschiedenen Charakterisierungs- und Isolationsmöglichkeiten führen daher in der Analyse von funktionellen Versuchsaufbauten zu unterschiedlichen Resultaten.

Klinische Relevanz

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren (Diabetes mellitus [40], Hypertonus [41], Hypercholesterinämie [42], Nikotinkonsum [43] und Adipositas [44]) signifikant weniger CD34⁺ EPC im Blut zirkulieren als bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren. Außerdem wurde gezeigt, dass die Verminderung der Risikofaktoren, zum Beispiel durch Nikotinkarenz [43], Gewichtsabnahme [44], Ausdauertraining [45], Einstellung des Blutzuckers mit Insulin [46] oder des Hypertonus mit Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Systems [47] und vor allem die Einnahme von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern (sogenannten Statinen) die Zahl der im peripheren Blut zirkulierenden EPC erhöhen kann [34]. Dies ist neben der Verringerung der Mortalität [48], der reduzierten Thrombogenität [49], der Unterdrückung von Entzündung im atherosklerotischen Gefäßendothel [50] und der Erhöhung der NO-Produktion desselben [51] ein weiterer der pleiotropen Effekte von Statinen. Der Arbeitsgruppe um Dimmel gelang es, den Signalweg der zur erhöhten Freisetzung von EPC unter Statintherapie führt, zu identifizieren [34]. Ob die vermehrt ausgeschütteten EPC jedoch funktionell gleichwertig zu EPC von Patienten ohne Statintherapie sind, oder ob deren immunologische Eigenschaften verändert sind wurde bisher noch nicht charakterisiert.

Neben Analyse der Quantität zirkulierender EPC konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Reparaturfähigkeit von EPC gerade in solchen Stadien der KHK vermindert ist, bei denen eine Schädigung des Endothels vorherrscht [41, 46, 47]. Die zu Grunde liegenden Mechanismen dieser verminderten Reparaturfähigkeit sind nur unzureichend geklärt.

Für eine diabetische Stoffwechsellage konnte so beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivität spezifischer Proteasen inhibiert ist, wodurch die Fähigkeit der EPC in Endothel einzudringen verschlechtert wird [52]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die NO (=Stickstoffmonoxid)-vermittelte Migration aus dem Knochenmark, wie auch die Funktionalität der aus dem peripheren

Blut isolierten humanen EPC in Abhängigkeit von kardiovaskulären Risikofaktoren negativ beeinflusst wird [52].

Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark

Eine Ischämie führt zur Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark [23, 53, 54]. Shintani et al. konnten zeigen, dass es bei akutem Myokardinfarkt zu einer vermehrten Mobilisation von EPC aus dem Knochenmark in die Peripherie kommt [54]. Dabei induziert SDF1 (= stromal-derived factor 1) die Aktivierung einer NO(=Stickstoffmonoxid)-abhängigen Kaskade, welche zur proteolytischen Lösung der EPC von den Bindegewebszellen des Knochenmarks und somit zu deren Freisetzung aus dem Knochenmarkstroma führt. Zytokine (z.B. Interleukin 6), Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) und Moleküle wie EPO oder NO können die Freisetzung von EPC erleichtern und somit eine erhöhte Zahl von EPC in der Peripherie bewirken [55].

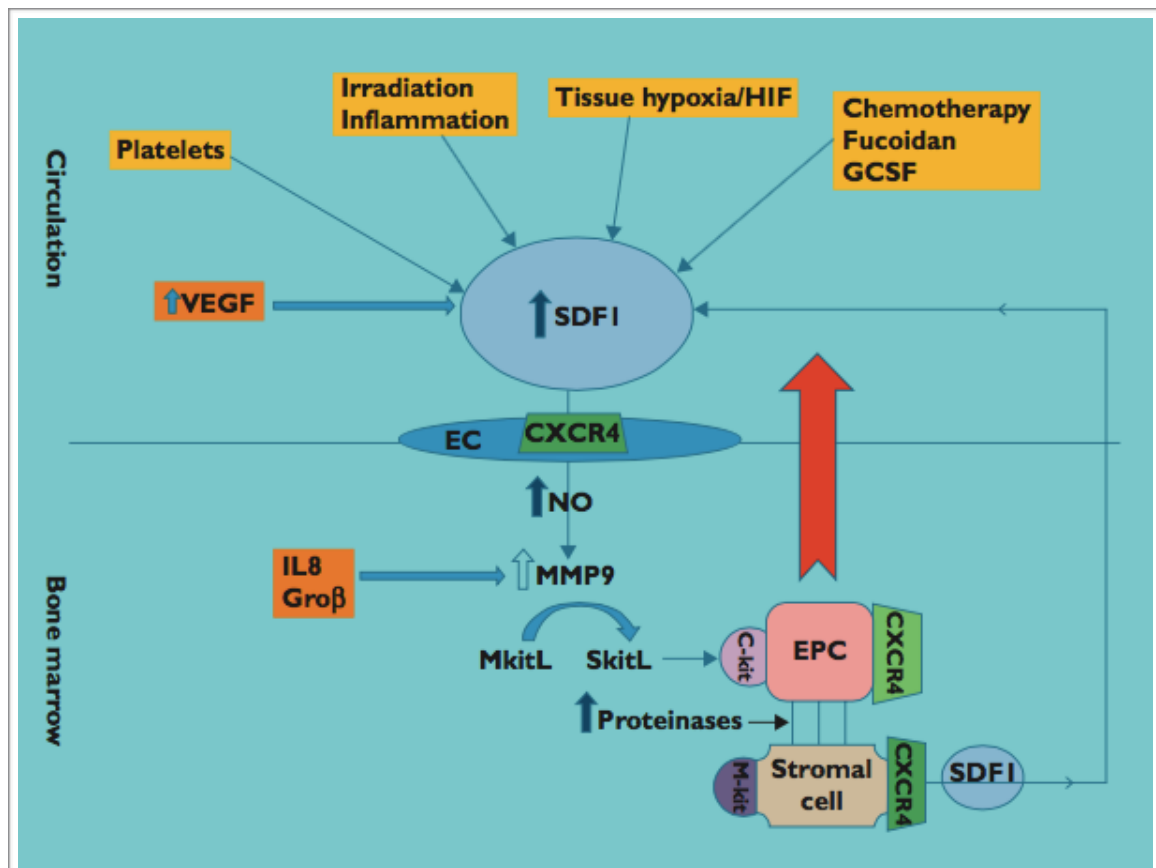


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark [57]

Durch Zelladhäsionsmoleküle, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Hormone erfolgt die Migration der Zellen in geschädigtes myokardiales Gewebe [55, 56], wo sie an der endothelialen Regeneration und der Plaquestabilisierung beteiligt sein können [57]. Dabei spielt der PI3K/Akt/eNOS Signalweg eine entscheidende Rolle für Proliferation und Migration von EPC [58-60]. Das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren scheint vor allem über Beeinflussung des Pi3K/Akt/eNOS-Signalweges die EPC-Anzahl und deren Funktionalität zu erniedrigen.

Ob die Migration von CD34⁺ EPC in geschädigte Gebiete wirklich zu einer Verbesserung der Revaskularisierung und Plaquestabilität führt bleibt weiterhin fraglich. Die erworbenen Erkenntnisse bezüglich CD34⁺ EPC sind wichtig um die Regenerationsfähigkeit des Körpers zu verstehen und für therapeutische Zwecke zu nutzen. So erhofft man sich von einer möglichen Induktion zirkulierender CD34⁺ EPC zum Beispiel einen Ersatz von dysfunktionalem Endothel, die Regression von atherosklerotischen Plaques, bzw. die Regeneration mechanisch geschädigter Gefäßabschnitte nach Manipulationen (u.a. durch PTCA, Stenting).

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

Im peripheren Blut zirkulierende CD34⁺ EPC sind wie von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, quantitativ im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren vermindert [40, 41, 47]. Auf der anderen Seite werden CD34⁺ EPC bei ischämischen Ereignissen wie z.B. bei akutem Koronarsyndrom aus dem Knochenmark mobilisiert [54].

Unsere eigene Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Zell-Matrix-Kontakt für den funktionellen und immunologischen Phänotyp CD31⁺-Endothelzellen aus verschiedenen Gefäßbetten von großer Bedeutung ist [61]. Dieser Zell-Matrix-Kontakt wird durch systemische Erkrankungen wie arteriellen Hypertonus, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder Autoimmunerkrankungen qualitativ alteriert [62-64]. So wird die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen sowie HLA-DR durch Modifikation der zugrundeliegenden subendothelialen Basalmembran reguliert [61]. Dadurch wird möglicherweise die Migration von Immunzellen angeregt, welche wiederum die Aktivierung und Schädigung des Endothels vorantreiben.

Patienten mit akutem Koronarsyndrom weisen im systemischen Blut eine nachweisbare Aktivierung des Immunsystems auf [65, 66]. Wir postulieren deshalb, dass im peripheren Blut zirkulierende CD34⁺ endotheliale Progenitorzellen - losgelöst von der Matrix des Knochenmarkes - in diesem inflammatorischen systemischen Milieu ebenfalls immunologisch aktiviert werden: im peripheren Blut zirkulierende EPC weisen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen, MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen auf.

Im Detail soll als Ausdruck der Immunaktivierung die Ausprägung der mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD 86, sowie von HLA-DR auf aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ endothelialen Progenitorzellen charakterisiert werden.

Zudem soll der in vitro Einfluss proinflammatorischer Moleküle (TNF α und IFN γ), sowie der Einfluss einer bestehenden Statintherapie auf die Genexpression von Oberflächenmarkern auf aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

Studienpopulation

Es wurden vier Patientenpopulationen in die Studie eingeschlossen. Die Einteilung erfolgte anhand der klinischen Präsentation. Ein positives Votum zur Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der LMU München erteilt.

Die erste Gruppe (n=18) bestand aus gesunden Probanden, bei welchen das Vorliegen einer KHK mittels invasiver Untersuchung oder anhand eines fehlenden Risikoprofils und unauffälliger nicht-invasiver Untersuchung (Ergometrie, Intimadicke im Carotisduplex) ausgeschlossen wurde.

Die zweite Gruppe bestand aus Patienten mit stabiler KHK (n=18). Alle Patienten wiesen eine klinisch stabile Anamnese auf. Die klinische Einteilung erfolgte anhand der CCS-Klassifikation, eine von der kanadischen Gesellschaft für Kardiologie (CCS= canadian cardiolovascular society) entwickelte Klassifikation der Angina pectoris. Mittels Koronarangiographie konnte bei allen dieser Patienten eine koronare Makroangiopathie ohne Vorliegen hämodynamisch relevanter Stenosen diagnostiziert werden.

Bei der dritten Gruppe (n=15) handelte es sich um Patienten mit instabiler KHK. Diese beinhaltete Patienten mit instabiler Angina pectoris (n=7) und nicht ST-Hebungs-Infarkt (NSTEMI, Troponin positiver Myokardinfarkt ohne ST-Strecken-Hebung im EKG) (n=8).

In die letzte Gruppe wurden ausschließlich Patienten mit STEMI (Myokardinfarkt mit ST-Strecken-Hebung) aufgenommen (n=5).

Ausschlusskriterien waren ein in den letzten sechs Monaten stattgehabter Myokardinfarkt oder ein anderes ischämisches Ereignis (z.B. pAVK, zerebrale

Ischämie), Blutabnahme mehr als 6 Stunden nach Symptombeginn (Gruppe 3 und 4), systemische Entzündungszeichen (CRP>0,5mg/dl, Leukozyten>10000/ μ l), Autoimmunerkrankungen, paraneoplastische Erkrankungen, Lebererkrankungen, dialysepflichtige Niereninsuffizienz oder Herzklappenfehler.

Blutentnahme und -aufbereitung

Von Patienten mit akutem Koronarsyndrom (instabile AP, NSTEMI, STEMI) oder stabiler KHK wurde jeweils 100ml Vollblut im Rahmen der invasiven Untersuchung direkt nach arterieller Punktion und Aspiration aus der arteriellen Schleuse entnommen und sofort mit 4 μ l Natriumheparin in zwei 50ml Falcon Röhrchen (BD) überführt und vermischt.

Die Blutentnahme bei gesunden Probanden erfolgte entweder nach invasivem Ausschluss einer KHK (n=4) ebenfalls durch die arterielle Schleuse oder bei Probanden mit unauffälliger, nichtinvasiver Untersuchung und fehlendem Risikoprofil durch Blutentnahme über die Cubitalvene (n=14). In hier nicht dargestellten Vorversuchen hatten sich keine Unterschiede in Messergebnissen zwischen arterieller und venöser Blutentnahme gezeigt.

Materialien

Puffer, Lösungen

- PBS-Lösung, 500ml von Biochrom
- Biocoll Separating Solution, 500ml von Biochrom
- Isolation Buffer, selbst hergestellt aus 0,1%BSA (Albumine Bovine von Sigma Solution), 2mM EDTA, 500ml PBS
- Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell)

Reagenzien, Antikörper, Primer

- Trizol Reagent, 100ml von Invitrogen
- Dynabeads FlowComp Flexi Kit von Invitrogen
- Mouse Anti-CD34 (Stem Cell) Antikörper von Invitrogen
- CD34 Antibody (FITC) von BD Bioscience
- iScript cDNA Synthesis Kit von BioRad
- Sso Advanced SYBR Green Supermix von BioRad
- GAPDH, CD80, CD86, ICAM-1, VCAM-1 Primer von Metabion
- TNF α von Roche
- Interferon gamma von Roche

Tubes, Pipettenspitzen, Filter

- ThermoTube PCR Tubes 0,2ml von PeqLab
- Leukosep-Röhrchen mit Trennscheibe, 50ml von Greiner Bio-One
- BD Falcon Röhrchen, konisch, 50ml und 15ml von Omnilab
- Safe Lock Tubes 1,5ml und 2ml von Eppendorf
- UVette 220-1600nm von Eppendorf
- ep Dualfilter TIPS, steril, PCR clean von Eppendorf
- Spritzenvorsatz-Filter 25mm von VWR

Geräte

- Rotina 46 R Zentrifuge von Hettich
- Mikro 22 R Zentrifuge von Hettich
- iCycler (PCR-Cycler mit dem Programm iQ5) von BioRad
- Gene Amp PCR System 9700 von PE Applied Biosystems
- BioPhotometer Plus von Eppendorf
- Mikroskop Axiovert 25 von Zeiss
- Immunfluoreszenzmikroskop

Isolation von CD34⁺Zellen

Zur Vorbereitung der Zellisolation, wurde je 20-25ml heparinisiertes Vollblut mit 10-15ml PBS (Biochrom) in Leukosep-Röhrchen mit Trennscheibe (Greiner Bio-One) gefüllt, welche mit 15ml Bicolll-Seperating Solution (Biochrom) befüllt waren. Anschließend wurden die gefüllten Röhrchen 20 Minuten bei 2250 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund des Dichtegradienten mit Ficoll bilden sich drei Schichten. Die oberste Schicht besteht aus Blutplasma, die nächste enthält mononukleäre Zellen und schließlich, durch die Trennscheibe getrennt, die dichteren Blutbestandteile wie Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Die Zellschicht, welche die mononukleären Zellen enthält, wurde abpipettiert, zwei Mal mit Isolation Buffer gewaschen und gezählt. Damit gewonnene Zellzahlmenge variierte von $1,65$ bis $15,75 \times 10^7$ Zellen.

Die isolierten mononukleären Zellen wurden anschließend mit einem anti-CD34-Mouse-Antibody (Invitrogen) für zehn Minuten bei 4°C inkubiert, Flow-Comp-Flexie Dynabeads (Invitrogen) 15 Minuten bei 4°C unter Bewegung an die Antikörper beschichteten CD34⁺Zellen gebunden und schließlich die an die Beads gebundenen CD34⁺Zellen mithilfe eines Magneten isoliert. Nach einem Waschschrift mit Isolation-Buffer wurde der Release-Buffer zugegeben, die Zellen 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Bewegung von den Beads gelöst und dann die freien Zellen wieder unter Einsatz des Magneten entfernt.

Die Hälfte der Zellen wurde anschließend vier Stunden mit 10 ng/ml TNF α im Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell) bei Raumtemperatur inkubiert und danach in Trizol gelöst. Der andere Teil wurde sofort und ohne vorherige Inkubation in Trizol gelöst.

Außerdem wurden Zellen einiger Probanden einer vierstündigen Stimulation mit 1 μ g/ml IFN γ im Zellmedium, ebenfalls bei Raumtemperatur, zugeführt.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert, die TNF α - bzw. IFN γ -Lösung abpipettiert, die Zellen in Trizol gelöst und bei -80°C eingefroren.

Immunfluoreszenzfärbung

Um die Reinheit der CD34⁺ Isolation zu demonstrieren, wurde ein Teil der Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung mit CD34-Antikörpern (FITC, BD Bioscience) zugeführt. Dabei wurde die Zellsuspension auf einen Objektträger pipettiert und nach Verdunsten des Mediums mit 4% Formalin in PBS 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, gefolgt von einer Waschung in PBS. Bei Raumtemperatur folgte nun die Permeabilisierung und der Proteinblock mit 0,05% Triton und 5% BSA in PBS für 15 Minuten. Abschließend wurde eine erneute Spülung mit PBS durchgeführt. Schließlich wurde der CD34-Antikörper in der Verdünnung 1:100 aufgetragen, 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Box inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Die Kernfärbung wurde mit DAPI, 1:500 verdünnt, durch Auftragung und anschließender fünfminütiger Inkubation durchgeführt. Danach wurde ein letztes Mal mit PBS gespült. Anschließend wurde der getrocknete Objektträger sofort unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert. Die Auszählung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer.

RNA-Isolation aus isolierten CD34⁺Zellen

Um die Expression der Oberflächenmoleküle in der realtime-PCR messen zu können, muss die cDNA der Zellen isoliert werden, was zunächst die RNA-Isolation mit Trizol/Chlorophorm voraussetzt. Dabei wurden die in Trizol gelösten Zellen mit Chlorophorm gemischt und der wässrige Überstand mit der gelösten RNA nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C abpipettiert. Die RNA wurde durch zehnminütige Inkubation mit Isopropanol und anschließender zehnminütiger Zentrifugation ausgefällt. Nach der Waschung mit 75% Ethanol,

wurde das vorhandene Pellet in destilliertem Wasser gelöst und die Menge und Qualität der RNA im BioPhotometer Plus (Eppendorf) gemessen.

cDNA-Synthese

Die Umschreibung von cDNA aus 1µg RNA wurde mit dem iScript cDNA Synthesis Kit von BioRad, im Gene Amp PCR System 9700 von PE BioSystems durchgeführt. Dabei wurde je 1µl reverse Transkriptase mit 4µl reaction mix eingesetzt, die RNA zugefügt und bis auf 20µl mit RNase und DNase freiem Wasser aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 5 Minuten bei 25°C, dann 30 Minuten bei 42°C und schließlich 5 Minuten bei 85°C inkubiert. Die cDNA wurde zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

Real Time PCR

Die Real Time PCR erfolgte mithilfe des iCycler von BioRad. Die Primer wurden mit dem online erhältlichen Programmen Primer 3 oder Primer 3+ erstellt. Neben der optimalen Annealing-Temperatur, welche für jeden Primer anhand eines Temperaturgradienten bestimmt wurde, wurde außerdem jeweils eine Verdünnungskurve erstellt, um die gleiche Funktion der Primer bei verschiedenen Ziel-Gen Expressionslevels zu zeigen.

Im Folgenden sind die DNA-Sequenzen der entsprechenden Primer und die spezifischen Annealing-Temperaturen dargestellt:

GAPDH

60°C

forward: 5'-CGC TGA GTA CGT CGT GGA GTC-3'

reverse: 5'-GCA GGA GGC ATT GCT GAT GA-3'

CD80

60°C

forward: 5'-TAA GGT AAT GGC ACC ACA GCT TC-3'

reverse: 5'-TTG TGA TAT GCT GCC TGA CC-3'

CD86

60°C

forward: 5'-GCT GCA ACG GAA TTA GGA AG-3'

reverse: 5'-TTT CCT CTG GTT GCC TTG AG-3'

ICAM-1

60°C

forward: 5'-GGC TGG AGC TGT TTG AGA AC-3'

reverse: 5'-TCA CAC TGA CTG AGG CCT TG-3'

VCAM-1

60°C

forward: 5'-TAA ATT GCC TGG GAA GAT GG-3'

reverse: 5'-GGT GCT GCA AGT CAA TGA GA-3'

HLA-DR

60°C

forward: 5'-AGA CAA GTT CAC CCC ACC AG-3'

reverse: 5'-AGC ATC AAA CTC CCA GTG CT-3'

Abbildung 3: DNA-Sequenzen und spezifische Annealing-Temperaturen der Primer

Pro Reaktion wurden dabei jeweils 2µl cDNA, je 500nM forward- und reverse Primer (entsprach je 1µl Primer) und 10µl Sso advanced SYBR-Green Supermix (BioRad), welcher dNTPs in äquimolaren Mengen, DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid, einen optimalen Reaktionspuffer und einen Farbstoff enthält, eingesetzt und mit 6µl RNase und DNase freiem Wasser auf 20µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Für jede DNA-Probe erfolgte eine Doppelbestimmung. Außerdem wurde für jeden Primer eine Negativprobe eingesetzt, um eventuelle Verschmutzungen zu detektieren. Für die Negativprobe wurde die cDNA durch 2µl Wasser ersetzt.

Im iCycler von Biorad wurde für die Real Time PCR für die einzelnen Zyklen folgendes Programm festgelegt:

Die Aktivierung der DNA-Polymerase erfolgt durch die dreiminütige Erhitzung auf 95°C.

Der anschließende PCR-Zyklus setzte sich zusammen aus einer zehn Sekunden dauernden Denaturierungsphase bei 95°C, gefolgt von einer Annealing-Phase, welche 25 Sekunden dauert und einer abschließenden Extensionsphase für 15 Sekunden. Dieser Zyklus wurde 45 mal wiederholt. Nach einem einminütigen Zwischenzyklus bei 95°C wurde die Schmelzkurve in 0,5°C Schritten, von 55°C bis 95°C, geschrieben. In der Schmelzkurve wird die Temperatur kontinuierlich erhöht und die polymerisierte Doppelstrang-DNA dissoziiert an ihrem, für sie spezifischen Schmelzpunkt, in zwei Einzelstränge. Somit wird die Freisetzung des zuvor eingefügten Farbstoffs (SYBR-Green) evoziert und die Fluoreszenz vom iCycler registriert. In jedem Zyklus findet also die Verdopplung des Ursprungsmaterials statt.

Die Auswertung erfolgte durch Semiquantifizierung des Transkriptionslevels der jeweiligen Gene mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Die Normalisierung erfolgte durch Korrektur des Mittelwertes der jeweiligen Doppelbestimmung jedes PCR-Produktes, mit dem konstitutiv exprimierten „house keeping gene“ GAPDH.

Ct ist hierbei der „cycle threshold“, das heißt der Schwellenwert-Zyklus, bei dem erstmals die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Δ Ct zeigt den Unterschied zum Housekeeping-Gene GAPDH auf, welches auf allen Zellen gleich stark exprimiert wird und somit Unterschiede in der Menge der eingesetzten cDNA ausgeglichen werden. Je niedriger Δ Ct, desto geringer ist der Abstand zur Expression von GAPDH und desto höher ist die Expression des betreffenden Templates (= die DNA-Sequenz welche untersucht wird). Mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode wird anschließend die Differenz zwischen den zwei Δ Ct-Werten verschiedener Gruppen berechnet und in die Gleichung 'n-fache Expression (z.B. Gruppe „gesund“ zu Gruppe „stabile KHK“) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ' eingesetzt.

ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Um die Konzentration von TNF α (in pg/ml) im Serum von Patienten ohne KHK (Kontrolle), stabiler KHK, instabiler KHK und akutem Myokardinfarkt zu ermitteln, wurde ein ELISA der Firma R&D Systems genutzt. Ein enzymbeladener Antikörper wird hierbei gegen TNF α gerichtet. Die Zugabe des chromogenen Substrats ermöglicht daraufhin die Messung der Extinktion des Reaktionsprodukts mit Hilfe eines Spektrophotometers.

Die Blutentnahme erfolgte zum gleichen Zeitpunkt wie die Entnahme für die CD34-Analyse. Der ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Statistische Auswertung

Bei den Proben wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test eine Normalverteilung überprüft und in einem Histogramm dargestellt. Bei den normalverteilten, unverbundenen oder verbundenen Stichproben fand der T-Test Anwendung, bei den unverbundenen Stichproben ohne Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bei den verbundenen Stichproben ohne Normalverteilung wurde der Wilcoxon-Test eingesetzt. Wurden mehr als zwei Stichproben verglichen kamen der Anova-Test für normalverteilte und der Median-Test für nicht normalverteilte Stichproben zur Anwendung.

Bei $p < 0,05$ wurde ein signifikanter Unterschied angenommen. Die Auswertung für alle Proben wurde mit SPSS durchgeführt. Es erfolgte eine Beratung durch das Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der LMU München.

4. Ergebnisse

Charakterisierung des Patientenkollektivs

Gesunde Probanden:

Das Durchschnittsalter der 18 gesunden Probanden betrug 36 ± 20 Jahre. Die Hälfte davon war männlich. In der gesamten Gruppe fanden sich keine Risikofaktoren für koronare Herzkrankheit. Die Probanden standen unter keiner regelmäßigen Medikamenteneinnahme.

Stabile KHK:

Die Gruppe der Patienten mit stabiler KHK beinhaltete 18 Patienten, wovon 15 (83,3%) männlich waren. Das Durchschnittsalter betrug 75 ± 6 Jahre. Jeder der Patienten litt unter einem arteriellen Hypertonus, wobei nur zwölf (66,7%) mit einem ACE-Hemmer oder Sartan behandelt wurden. 83,3% der Patienten mit stabiler KHK litten an einer Hyperlipoproteinämie und wurden mit einem Statin behandelt. Vier Patienten (22,2%) litten an einem Diabetes mellitus, wobei keiner unter Insulintherapie stand. Drei Patienten bekamen orale Antidiabetika. 15 Patienten (83,3%) nahmen zum Zeitpunkt der Probeentnahme ASS ein. Vier Patienten (22,2%) waren Raucher. Im Durchschnitt zeigte sich eine koronare Zweigefäßerkrankung mit einem mittleren Stenosegrad von $41 \pm 17,7\%$.

Instabile KHK:

Das Durchschnittsalter in der fünfzehn Probanden zählenden Gruppe der Patienten mit instabiler KHK betrug 72 ± 9 Jahre. Zwölf Patienten (80%) waren männlich. Zwölf der fünfzehn Probanden (80%) litten an einem arteriellen Hypertonus der bei neun Patienten mit einem ACE-Hemmer oder Sartan behandelt wurde. Neun Patienten litten an einer Hyperlipoproteinämie, die bei sieben mit einem Statin therapiert wurde. Zehn Patienten (66,7%) nahmen ASS ein. Es befand sich ein Diabetiker in der Gruppe der Patienten mit instabiler KHK, der jedoch keine oralen Antidiabetika nahm und nicht insulinpflichtig war. Fünf (33,3%) der Patienten waren Raucher. Im Durchschnitt zeigte sich eine

koronare Zweigefäßerkrankung mit einem mittleren Stenosegrad von $85,7 \pm 12,5\%$.

STEMI:

Die Gruppe der Patienten mit STEMI bestand aus fünf Patienten im durchschnittlichen Alter von 61 ± 16 Jahren. Vier (80%) von ihnen waren männlich. Vier litten an einem arteriellen Hypertonus der mit einem ACE-Hemmer oder Sartan behandelt wurde. Ein Patient litt an einer Hyperlipoproteinämie. Zwei Patienten nahmen zum Zeitpunkt der Probeentnahme ein Statin ein. Ein Patient war Diabetiker und mit einem oralen Antidiabetikum behandelt. Drei Patienten nahmen des Weiteren ASS ein. Zwei der fünf Patienten mit STEMI waren Raucher. Im Durchschnitt zeigte sich eine koronare Zweigefäßerkrankung mit einem mittleren Stenosegrad von $99 \pm 2,2\%$.

	Gesund (n=18)	stabile KHK (n=18)	instabile KHK (n=15)	STEMI (n=5)
Alter, Jahre	36±20	75±6 *	72±9 *	61±16
Männer	9 (50)	15 (83,3)	12 (80)	4 (80)
Hyperlipo- proteinämie	0 (0)	15 (83,3) *	9 (60) #	1 (20)
Hypertonus	0 (0)	18 (100) *	12 (80) + §	4 (80) #
Nikotin	0 (0)	4 (22,2)	5 (33,3)	2 (40) *
Diabetes mellitus	0 (0)	4 (22,2)	1 (6,7)	1 (20)
Statin	0 (0)	15 (83,3) *	7 (46,6) +	2 (40)
ACE-Hemmer/ Sartane	0 (0)	12 (66,7) +	9 (60) #	4 (80) *
ASS	0 (0)	15 (83,3) *	10 (66,7) +	3 (60)
Insulin	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Orale Antidiabetika	0 (0)	3 (16,7)	0 (0)	1 (20)
Betablocker	0 (0)	14 (77,8) *	6 (40)	3 (60)

Tabelle 1: klinische Charakteristiken der Studienpopulation

± SD (Standardabweichung); Werte in Klammern= prozentualer Anteil,

Signifikanzberechnungen mittels Kruskal-Wallis-Test und Post-Hoc-Differenzierung

*p<0,05 vs. gesund; #p<0,01 vs. gesund; +p<0,001 vs. gesund; §p<0,001 vs. stabil

Immunfluoreszenzmikroskopie

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Reinheit der CD34⁺ EPC-Isolation bei allen erfolgten Isolationen sowohl aus dem arteriellen als auch aus dem venösen Blut von $97\% \pm 2,5\%$ gezeigt werden.

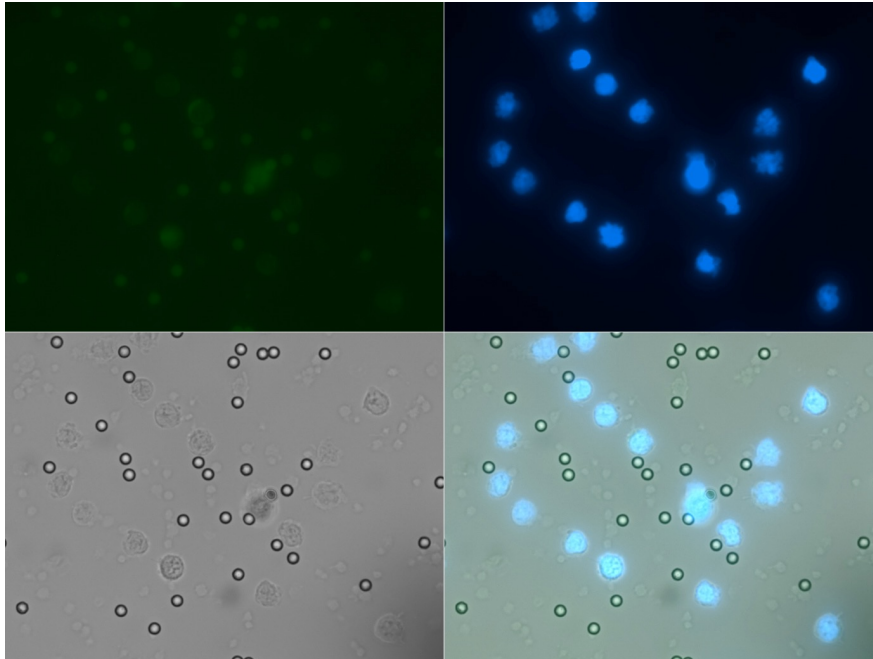


Abbildung 4: Beispielbild einer Immunfluoreszenzmikroskopie (blau: CD34⁺, grün: DAPI Zellkerne, runde Strukturen: Dynabeads)

Ergebnisse der Real Time PCR

Expression von Oberflächenmolekülen auf CD34⁺Zellen

ICAM-1

Unstimulierte Zellen

Es wurde die mRNA-Expression von ICAM-1 in aus dem peripheren Blut isolierten, unstimulierten CD34⁺Zellen gemessen. Für die gesunden Probanden errechnete sich ein Mittelwert von $4,71 \pm 1,03$, für die Patienten mit stabiler KHK $5,65 \pm 1,42$, für die Patienten mit instabiler KHK $5,25 \pm 1,07$ und für die Patienten mit STEMI errechnete sich ein Mittelwert von $4,55 \pm 1,69$.

Dabei waren die Werte bei gesunden Probanden im T-Test signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Patienten mit stabiler KHK ($p < 0,05$).

Der Vergleich der gesunden Probanden mit Patienten mit instabiler KHK ($p = 0,160$) und STEMI ($p = 0,804$) war im T-Test nicht signifikant. Auch beim Vergleich der Gruppe der Patienten mit stabiler KHK mit den Gruppen der instabilen KHK ($p = 0,367$) und STEMI ($p = 0,148$), sowie zwischen instabiler KHK und STEMI ($p = 0,289$), zeigte sich im T-Test kein signifikanter Unterschied.

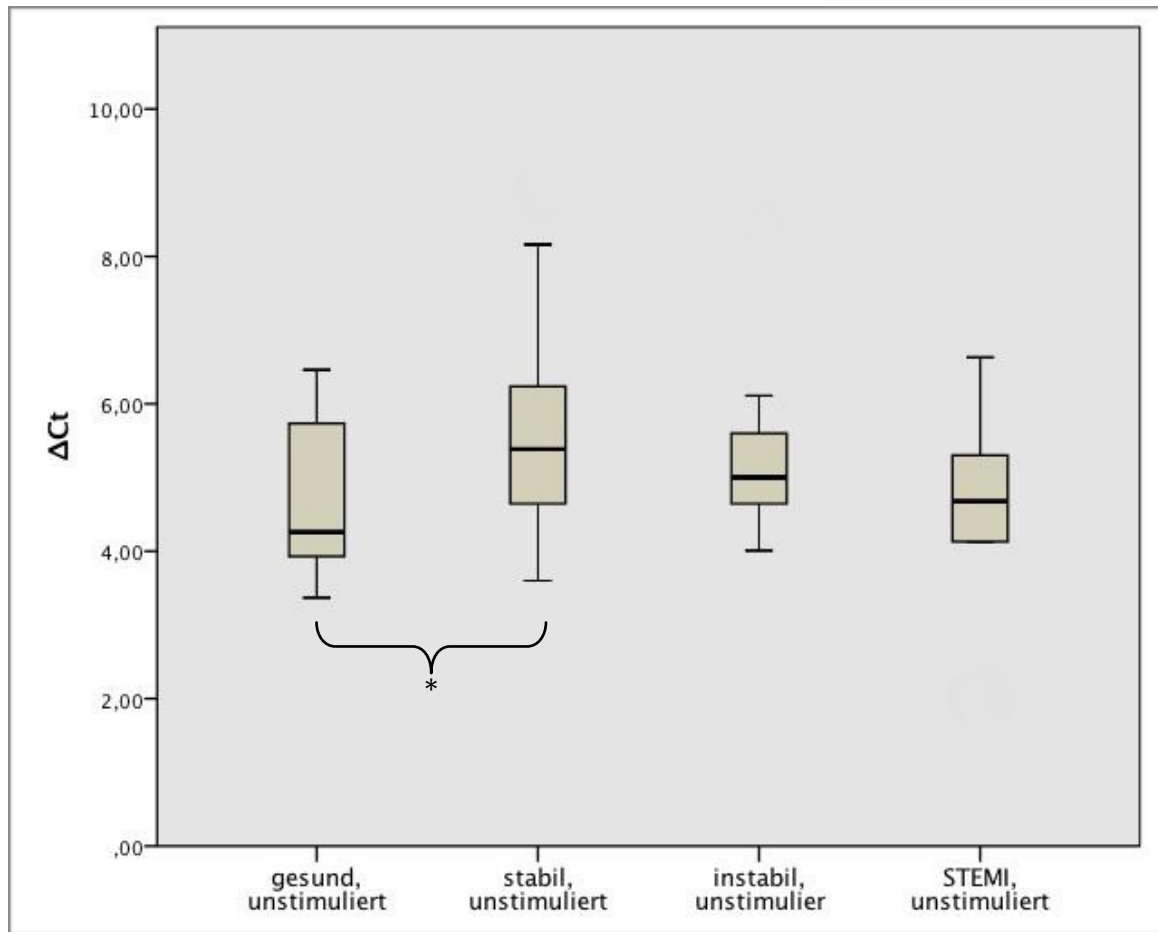


Abbildung 5: Expression von ICAM-1 auf unstimulierten CD34⁺Zellen, * p<0,05

Stimulierte Zellen

In aus dem peripheren Blut isolierten und ex-vivo mit TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen errechnete sich bei den gesunden Probanden ein Mittelwert der mRNA-ICAM-1 Expression von $3,94 \pm 0,64$. Der Mittelwert betrug bei Patienten mit stabiler KHK $3,93 \pm 0,75$, bei den Patienten mit instabiler KHK $3,96 \pm 0,71$ und bei den Patienten mit STEMI $4,09 \pm 0,26$.

Die Expression von ICAM-1 auf den mit TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen war im Median-Test für nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben zwischen den untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,449$), auch wenn ein Trend zu einer verminderten Expression bei Patienten mit STEMI gezeigt werden konnte.

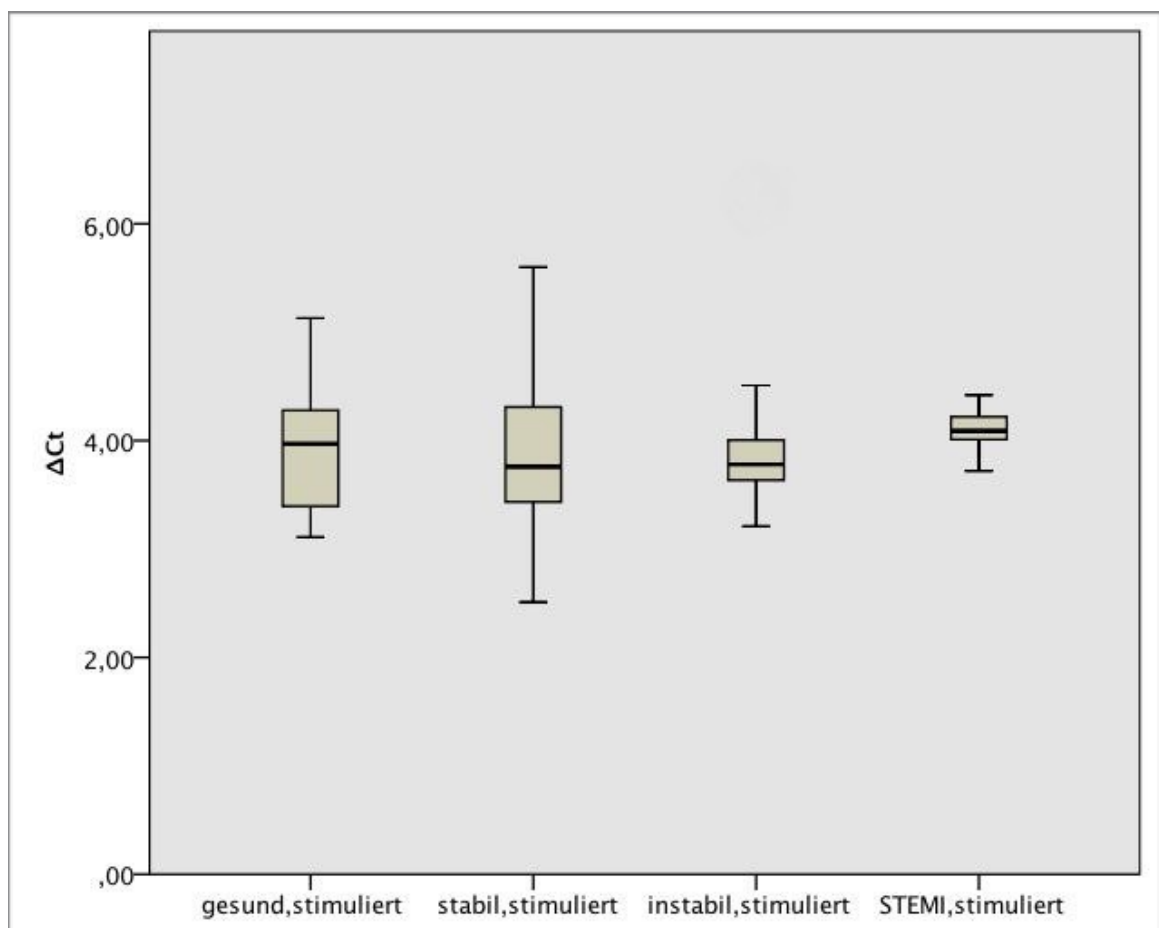


Abbildung 6: Expression von ICAM-1 auf stimulierten CD34⁺Zellen

Ausmaß der Steigerung nach Stimulation

Es zeigte sich in den Gruppen der gesunden Probanden ($p < 0,05$) und Patienten mit stabiler KHK ($p < 0,01$) im T-Test für verbundene und normalverteilte Stichproben, sowie bei den Patienten mit instabiler KHK ($p < 0,01$) im Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte Stichproben eine signifikante Steigerung der Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α , d.h. die Expression von ICAM-1 war nach Stimulation der Zellen signifikant höher als vor Stimulation mit TNF α .

Bei den Patienten mit STEMI zeigte sich im T-Test keine signifikante Steigerung der Expression von ICAM-1 nach Stimulation ($p = 0,559$).

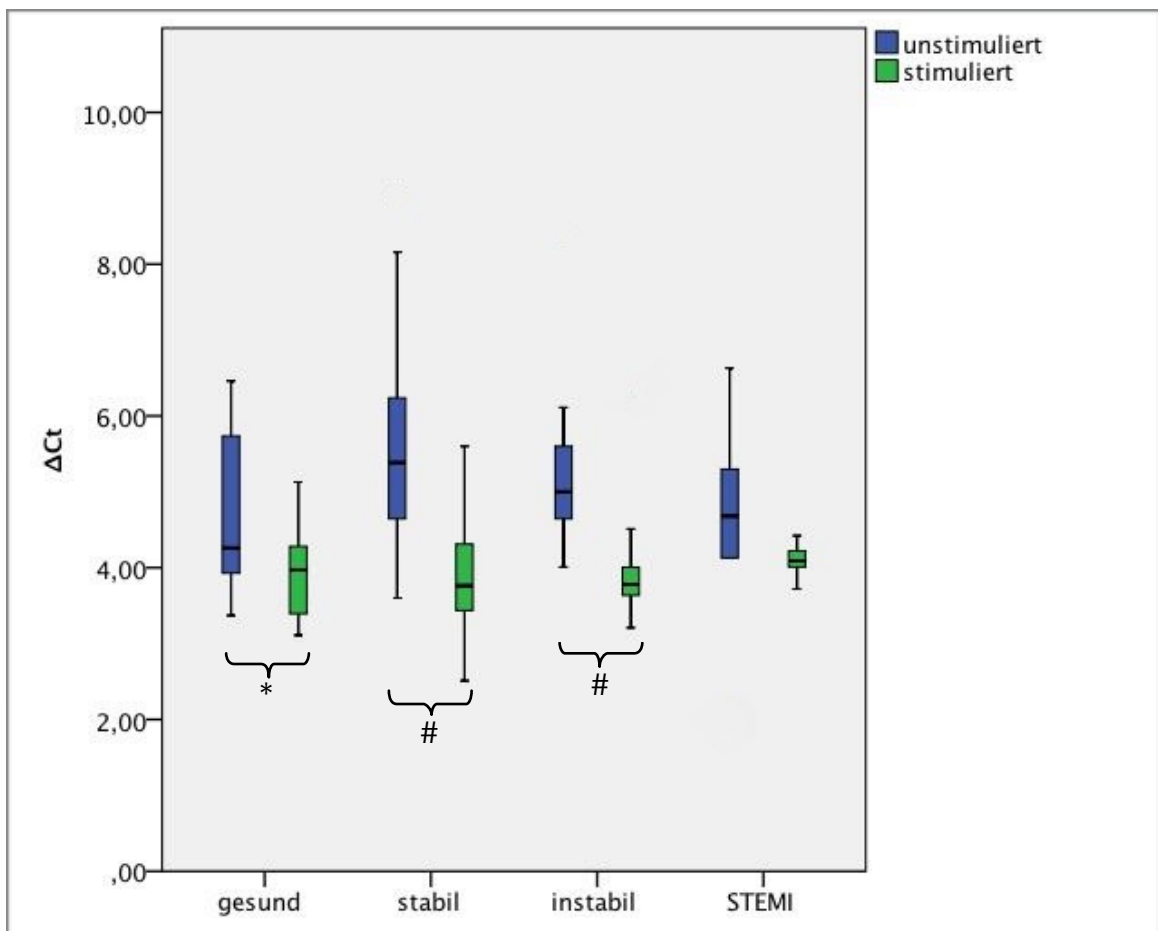


Abbildung 7: Ausmaß der Steigerung der ICAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α ; * $p < 0,05$; # $p < 0,01$

Nach Stimulation der aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen mit TNF α zeigte sich bezüglich der ICAM-1 Expression bei gesunden Probanden eine $2,81 \pm 2,21$ fache Steigerung. Bei Patienten mit stabiler KHK zeigte sich eine $5,05 \pm 6,94$ fache, bei Patienten mit instabiler KHK eine $2,65 \pm 1,03$ fache und bei Patienten mit STEMI eine $2,19 \pm 2,33$ fache Steigerung.

Hierbei zeigte sich im Median-Test für nicht normalverteilte, unverbundene Stichproben kein signifikanter Unterschied der ICAM-1 Induktion durch Stimulation im Vergleich miteinander ($p=0,353$).

Es wurde des Weiteren die Induzierbarkeit mittels IFN γ überprüft. Einige Zellen wurden statt einer vierstündigen Stimulation mit TNF α einer Stimulation mit IFN γ zugeführt und das Ergebnis der abschließenden realtime PCR mit dem Ergebnis unstimulierter Zellen verglichen. Nach vierstündiger Inkubation zeigte sich keine Expressionssteigerung von ICAM unter IFN γ Exposition.

VCAM-1

Unstimulierte Zellen

Der Mittelwert der mRNA VCAM-1 Expression in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen betrug bei gesunden Probanden $12,62 \pm 1,79$. Bei Patienten mit stabiler KHK betrug er $13,28 \pm 1,58$, bei Patienten mit instabiler KHK $12,77 \pm 1,53$ und bei Patienten mit STEMI konnte ein Mittelwert von $12,99 \pm 1,81$ berechnet werden.

Die mRNA Expression von VCAM-1 in den unstimulierten CD34⁺Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Der p-Wert betrug im ANOVA Test für normalverteilte, unverbundene Stichproben 0,683.

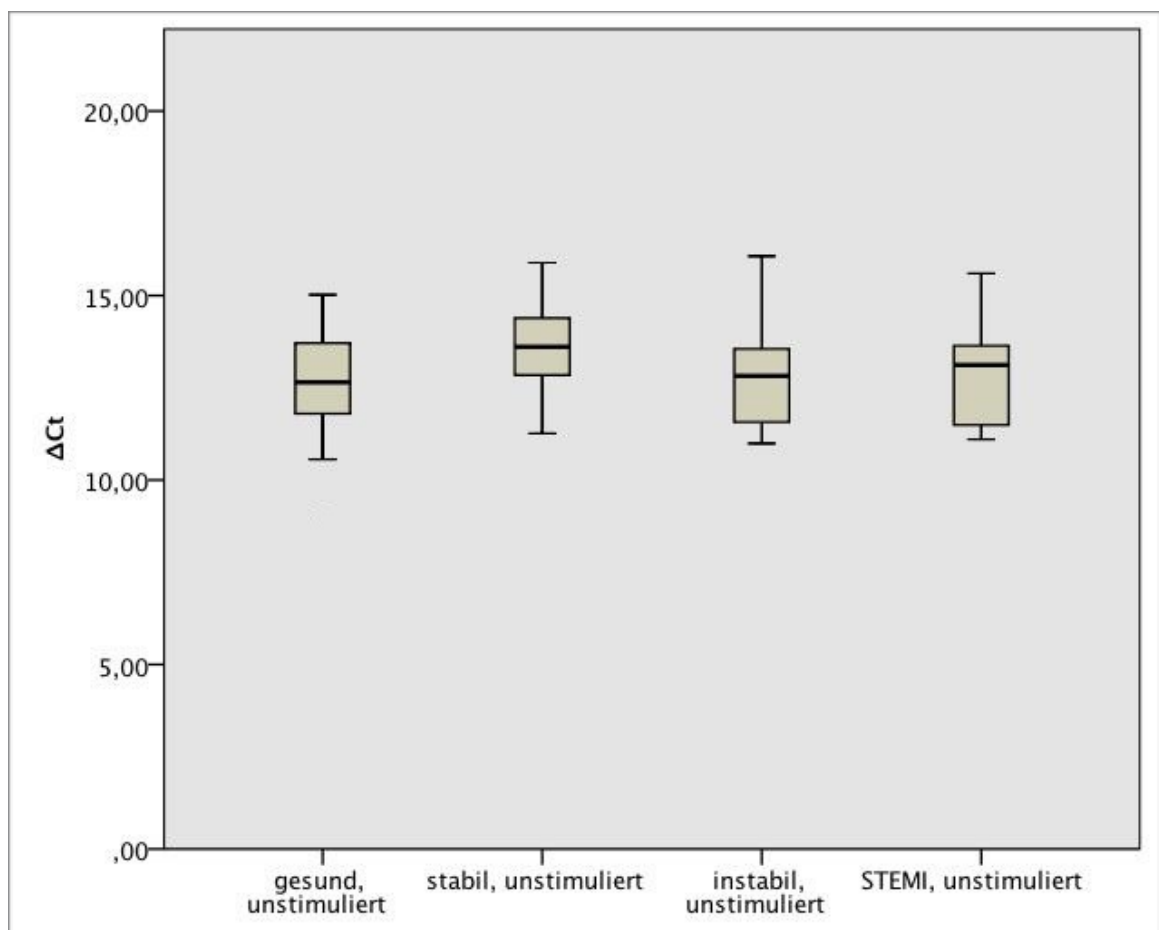


Abbildung 8: Expression von VCAM-1 auf unstimulierten CD34⁺Zellen

Stimulierte Zellen

Es wurden die Mittelwerte der mRNA VCAM-1 Expression in aus dem peripheren Blut isolierten und mit TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen überprüft. Bei den gesunden Probanden berechnete sich ein Mittelwert von $10,95 \pm 1,33$. Bei den Patienten mit stabiler KHK betrug der Mittelwert $11,58 \pm 1,81$, bei den Patienten mit instabiler KHK $10,61 \pm 1,70$ und bei den Patienten mit STEMI $10,80 \pm 1,61$.

Die mRNA Expression von VCAM-1 in den mit TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Gruppen. Der p-Wert im ANOVA-Test für normalverteilte, unverbundene Stichproben betrug 0,350.

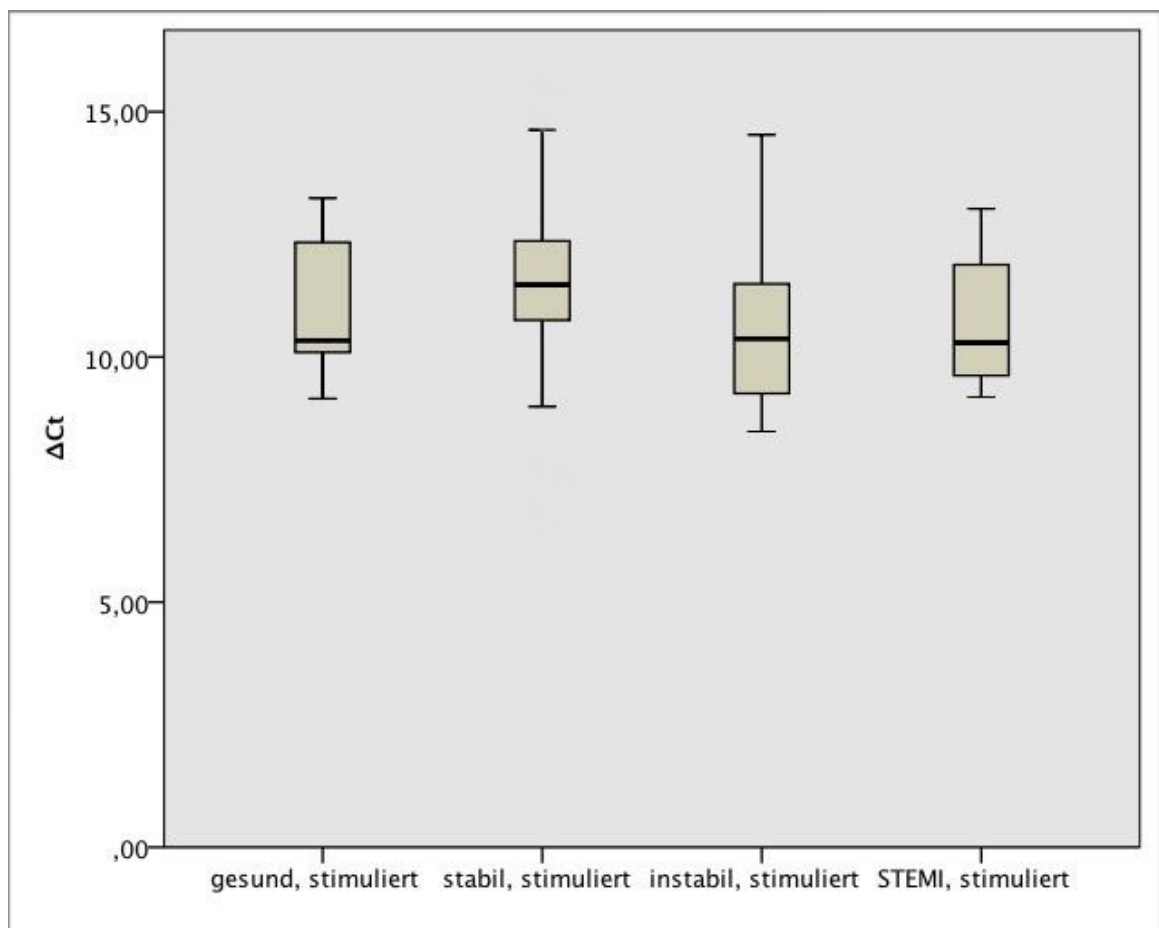


Abbildung 9: Expression von VCAM-1 auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen

Ausmaß der Steigerung nach Stimulation

Die mRNA Expression von VCAM-1 in den aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen nach Stimulation mit TNF α war in allen Gruppen im T-Test signifikant höher als vor Stimulation.

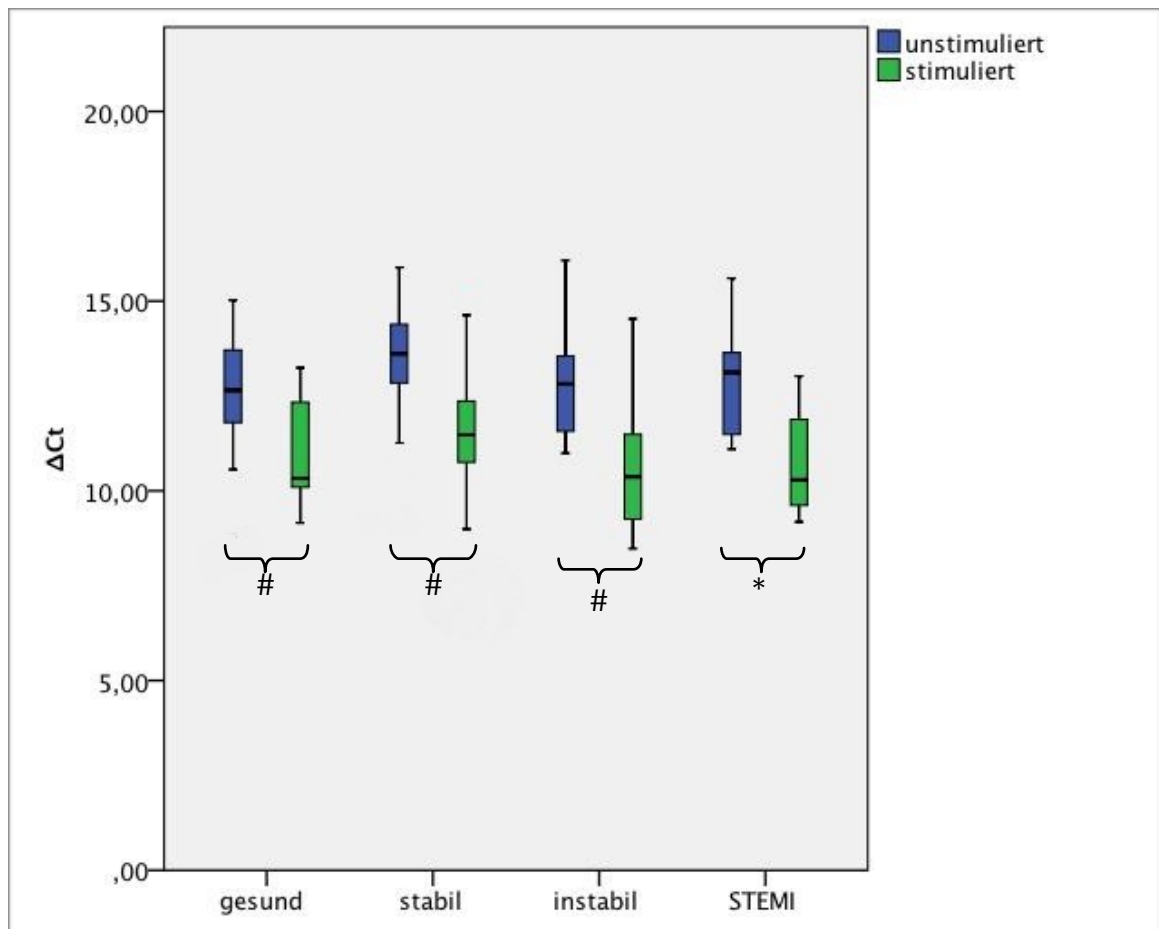


Abbildung 10: Ausmaß der Steigerung der VCAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α ; *p<0,05; #p<0,01

Bei den gesunden Probanden zeigte sich eine $3,74 \pm 2,56$ fache Steigerung ($p < 0,01$). Bei der Gruppe mit stabiler KHK konnte eine $4,33 \pm 3,40$ fache ($p < 0,01$), bei der Gruppe mit instabiler KHK eine $5,63 \pm 4,41$ fache ($p < 0,01$). und bei der Gruppe mit STEMI eine $5,91 \pm 4,58$ fache Steigerung gezeigt werden ($p < 0,05$).

Der ANOVA Test für unverbundene, normalverteilte Stichproben zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Höhe ihrer Steigerung nach Stimulation mit TNF α ($p=0,460$).

Die Induzierbarkeit der VCAM-1-Expression nach Stimulation mit IFN γ wurde ebenfalls überprüft. Hierbei zeigte sich nach vier Stunden Stimulation mit IFN γ keine Steigerung der Expression von ICAM-1.

CD80

Unstimulierte Zellen

Die errechneten Mittelwerte der mRNA Expression von CD80 in aus dem peripheren Blut isolierten und unstimulierten CD34⁺Zellen ergaben bei gesunden Probanden $11,57 \pm 1,65$, bei Patienten mit stabiler KHK $11,55 \pm 1,30$, bei Patienten mit instabiler KHK $11,78 \pm 0,90$ und bei Patienten mit STEMI $11,76 \pm 1,31$.

Die Expression von CD80 auf unstimulierten CD34⁺Zellen zeigte im Median-Test bei unverbundenen, nicht normalverteilten Stichproben keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p=0,926$).

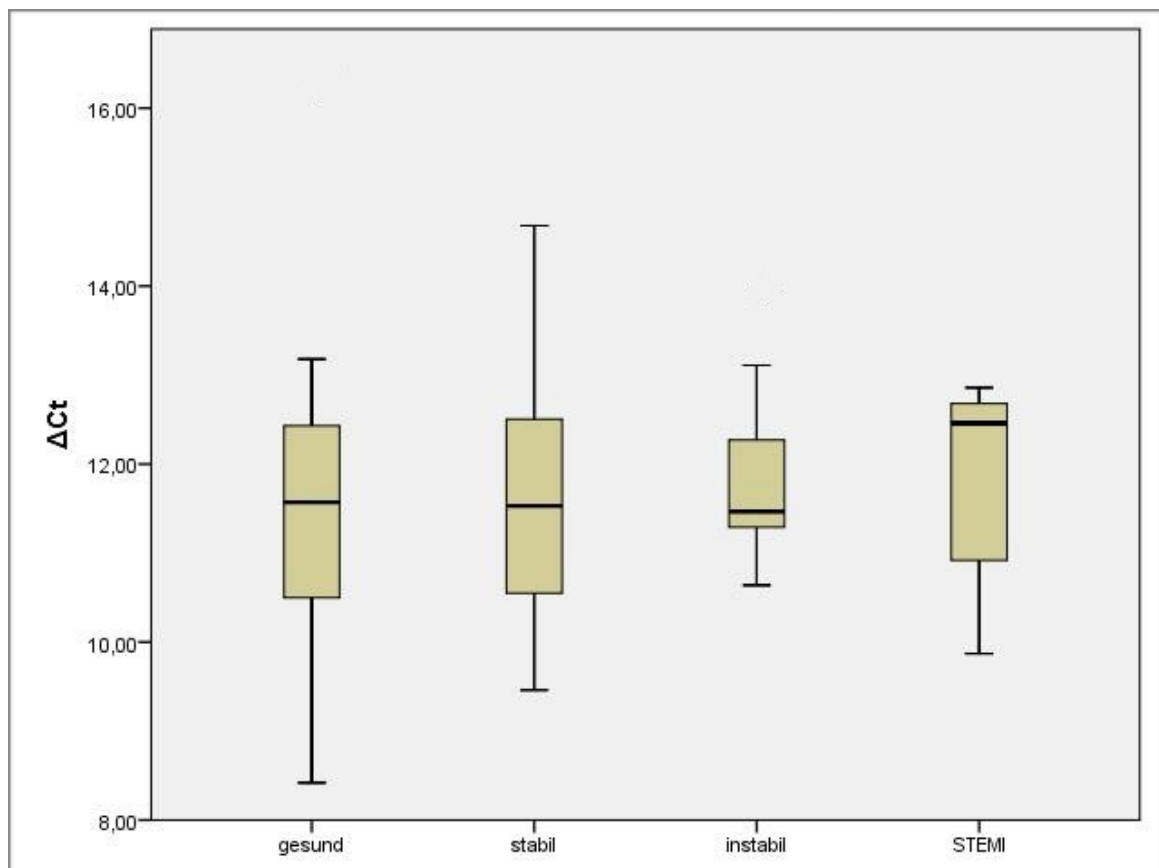


Abbildung 11: Expression von CD80 auf unstimulierten CD34⁺Zellen

Stimulierte Zellen

Es erfolgte eine Stimulation der Zellen sowohl mit TNF α als auch mit IFN γ . Es zeigte sich keine Induzierbarkeit der CD80-Expression.

CD86

Unstimulierte Zellen

Die errechneten Mittelwerte bei der mRNA Expression von CD86 in aus dem peripheren Blut isolierten und unstimulierten CD34⁺Zellen ergaben bei gesunden Probanden $5,38 \pm 0,62$, bei Patienten mit stabiler KHK $4,91 \pm 0,75$, bei Patienten mit instabiler KHK $5,64 \pm 0,27$ und bei Patienten mit STEMI $5,75 \pm 0,51$. Die mRNA Expression von CD86 bei Patienten mit instabiler KHK und STEMI war im Mann-Whitney-U-Test bei unverbundenen und nicht normalverteilten Stichproben, signifikant geringer als die Expression von CD86 bei Patienten mit stabiler KHK ($p < 0,05$). Zwischen den gesunden Probanden und der Gruppe mit stabiler KHK gab es im gleichen Test keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,110$). Beim Vergleich der Gruppe der gesunden Probanden mit den Gruppen der Patienten mit instabiler KHK ($p = 0,151$) und STEMI ($p = 0,236$) gab es im T-Test für unverbundene und normalverteilte Stichproben keine signifikanten Unterschiede.

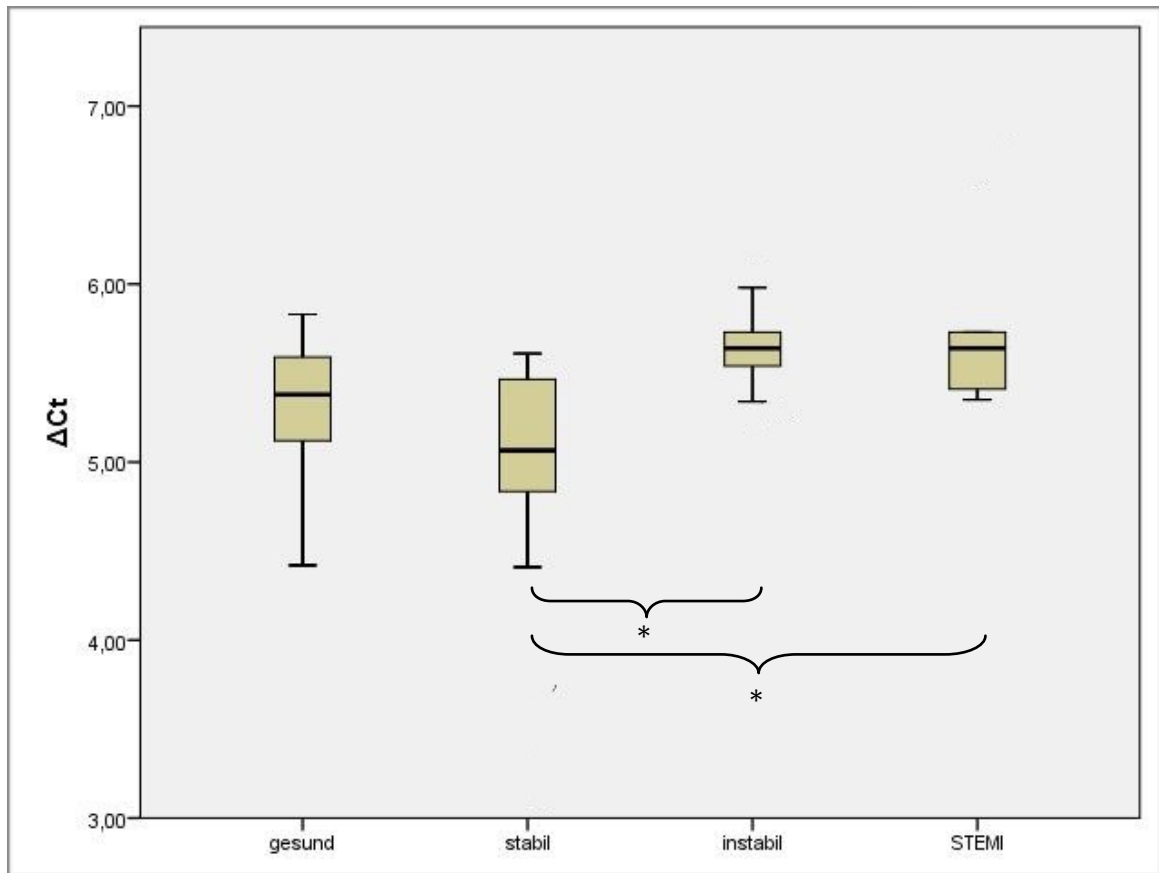


Abbildung 12: Expression von CD86 auf unstimulierten CD34⁺Zellen; *p<0,05

Stimulierte Zellen

Es erfolgte eine Stimulation der Zellen sowohl mit TNFα als auch mit IFNγ. Es zeigte sich keine Änderung der Expression von CD86 unter Zytokin-Exposition.

HLA-DR

Die Expression von HLA-DR war in allen Gruppen vergleichbar groß. ΔC_t betrug hierbei $-0,05 \pm 0,59$. Die HLA-DR-Expression zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich zur Höhe der GAPDH-Expression.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, weder auf Höhe der Grundexpression, noch nach Stimulation mit $TNF\alpha$ oder $IFN\gamma$.

Serumkonzentrationen von TNF α im Vergleich

Die TNF α Konzentration im Patientenserum betrug in der Kontrollgruppe $8,56 \pm 0,92$ pg/ml, bei Patienten mit stabiler KHK $10,66 \pm 1,95$ pg/ml und bei Patienten mit instabiler KHK $17,66 \pm 2,54$ pg/ml. Bei der Gruppe mit STEMI betrug die TNF α -Serumkonzentration $12,96 \pm 2,35$ pg/ml.

Der Unterschied zwischen instabiler KHK und der Kontrollgruppe bzw. der Gruppe mit stabiler KHK war mit $p < 0,01$ signifikant, ebenso wie der Unterschied zwischen instabiler KHK und STEMI mit $p < 0,05$ signifikant war.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der Kontrolle, stabiler KHK und STEMI.

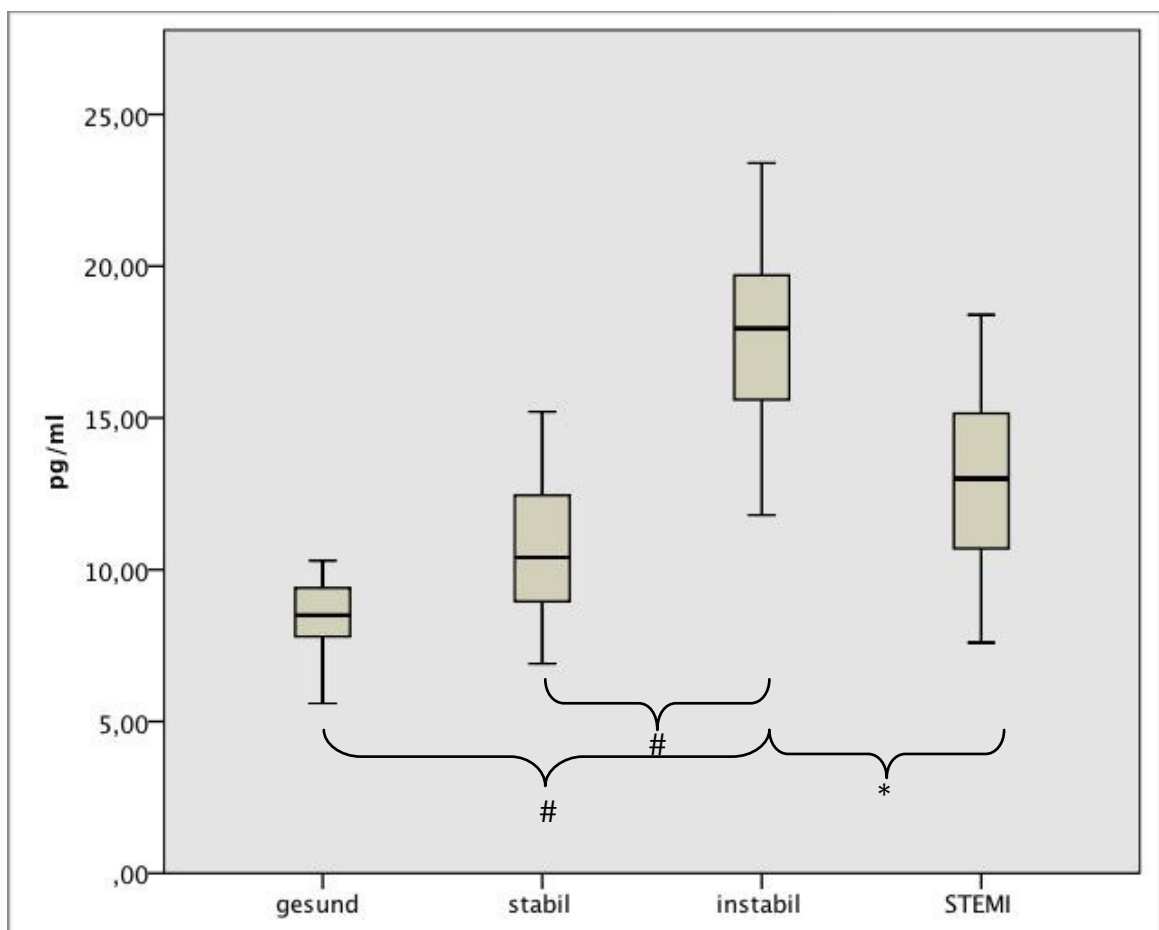


Abbildung 13: Serumkonzentrationen von TNF α ; * $p < 0,05$; # $p < 0,01$

Vergleich des Ausmaß der Hochregulation der Expression von ICAM- und VCAM-RNA in unstimulierten CD34⁺Zellen im Vergleich zur Serumkonzentration von TNF α

Wir verglichen die Serumkonzentration von TNF α mit dem Ausmaß der Steigerung von ICAM- und VCAM-RNA in den verschiedenen Patientengruppen. Die höchste Serumkonzentration von TNF α zeigte sich bei Patienten mit instabiler KHK, die geringste bei gesunden Probanden.

Das Ausmaß der Hochregulation von ICAM-1-RNA nach Stimulation mit TNF α zeigte keine signifikante Korrelation nach Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten ($p=0,452$). Tendenziell zeigte sich jedoch eine höhere TNF α -Konzentration bei Patienten mit stabiler KHK als bei gesunden Probanden. Vergleicht man die Patienten mit akuten Koronarsyndromen zeigte sich eine stärkere Hochregulation von ICAM-1-RNA bei instabiler KHK als bei Patienten mit STEMI.

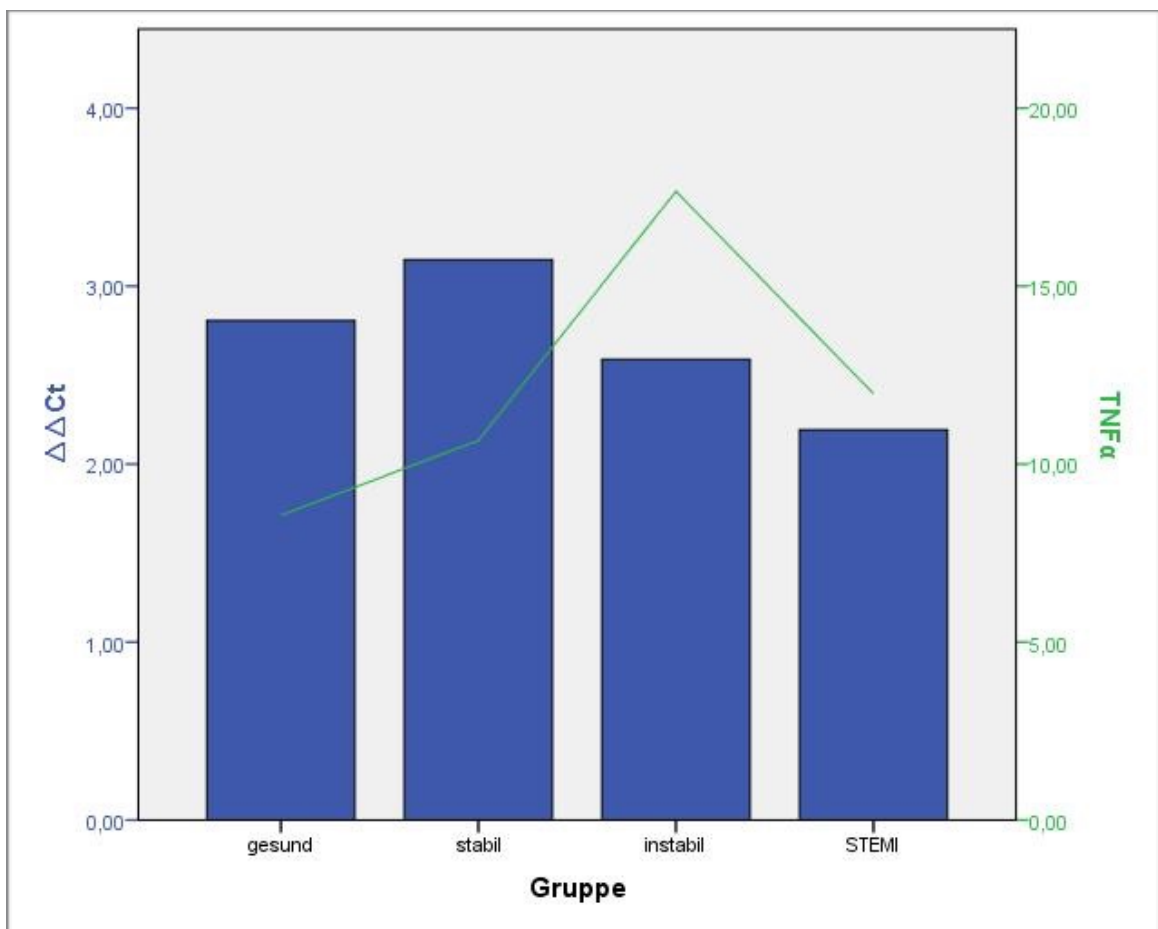


Abbildung 14: Steigerung der ICAM-1-Expression verglichen mit der TNF α -Konzentration

Bezüglich der VCAM-1-RNA-Hochregulation konnten wir eine Steigerung der Hochregulation von gesund über stabil bis hin zu den Patienten mit instabiler KHK zeigen. Bei Patienten mit STEMI fällt die TNF α -Serumkonzentration jedoch wieder. In der Berechnung des Spearman-Korrelationskoeffizienten besteht keine signifikante Korrelation ($p=0,114$).

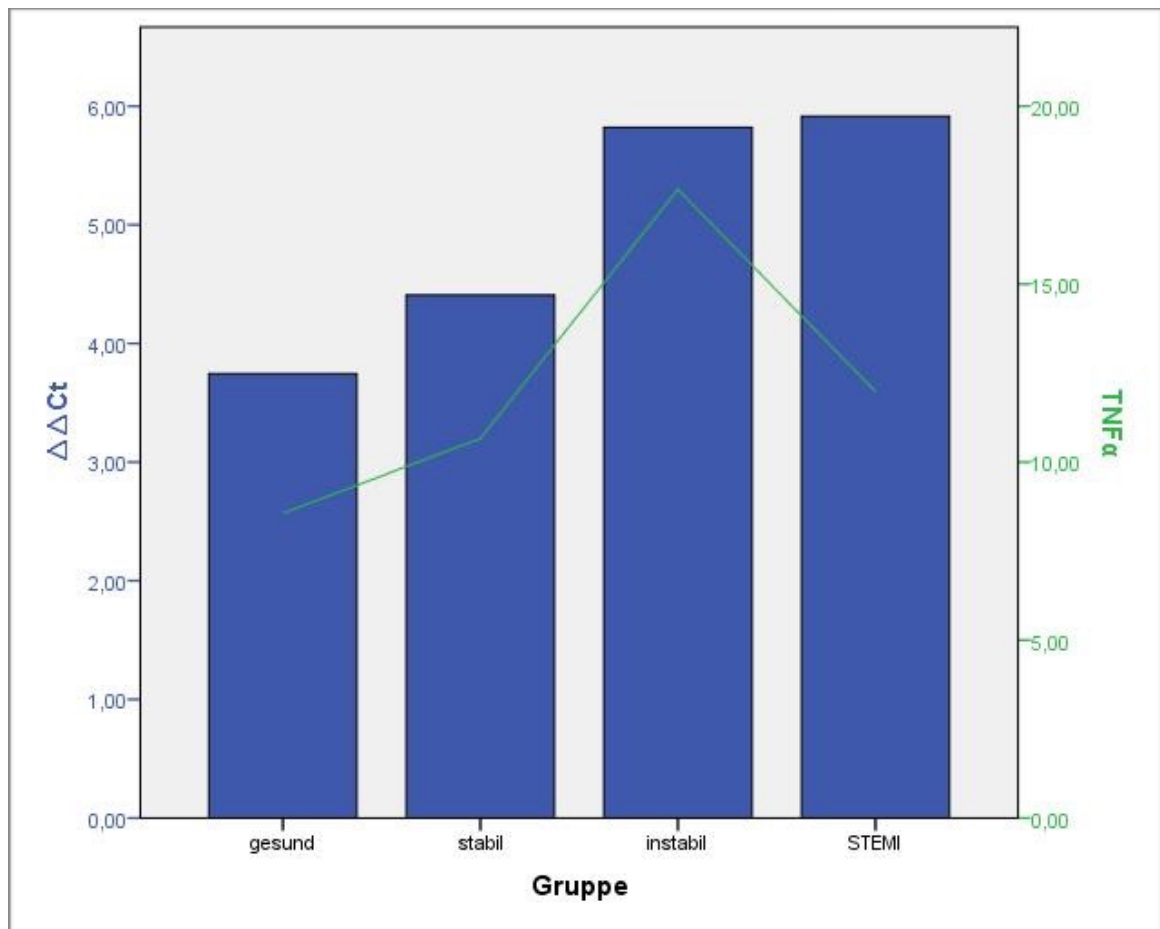


Abbildung 15: Steigerung der VCAM-1-Expression verglichen mit der TNF α -Konzentration

Vergleich der mRNA Expression von Oberflächenmolekülen in CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

Da die meisten der Patienten leitliniengerecht ein Statin einnehmen und da eine Korrelation zwischen Statineinnahme und der EPC-Menge im peripheren Blut der Patienten besteht [67-69], überprüften wir des Weiteren die Expression von ICAM-1 und VCAM-1, sowie CD80 und CD86 bei Patienten mit und ohne Statineinnahme und verglichen die Ergebnisse. Da unter den gesunden Probanden keiner ein Statin einnahm, konnten diese nicht weiter berücksichtigt werden.

ICAM-1

Unstimulierte Zellen

Der Mittelwert der Expression von ICAM-1 auf unstimulierten, aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen betrug $5,32 \pm 1,34$ in der Gruppe der stabilen KHK ohne Statineinnahme. In der Gruppe der stabilen KHK mit Statineinnahme betrug er $5,71 \pm 1,46$. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,338$).

In der Gruppe der instabilen KHK ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $5,10 \pm 0,69$ und in der gleichen Gruppe mit Statineinnahme $5,42 \pm 1,44$. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,305$).

Bei den Patienten mit STEMI betrug der Mittelwert der ICAM-1 Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen $3,82 \pm 1,66$ ohne Statineinnahme, während er bei der gleichen Gruppe mit Statineinnahme $5,66 \pm 1,38$ betrug. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,141$).

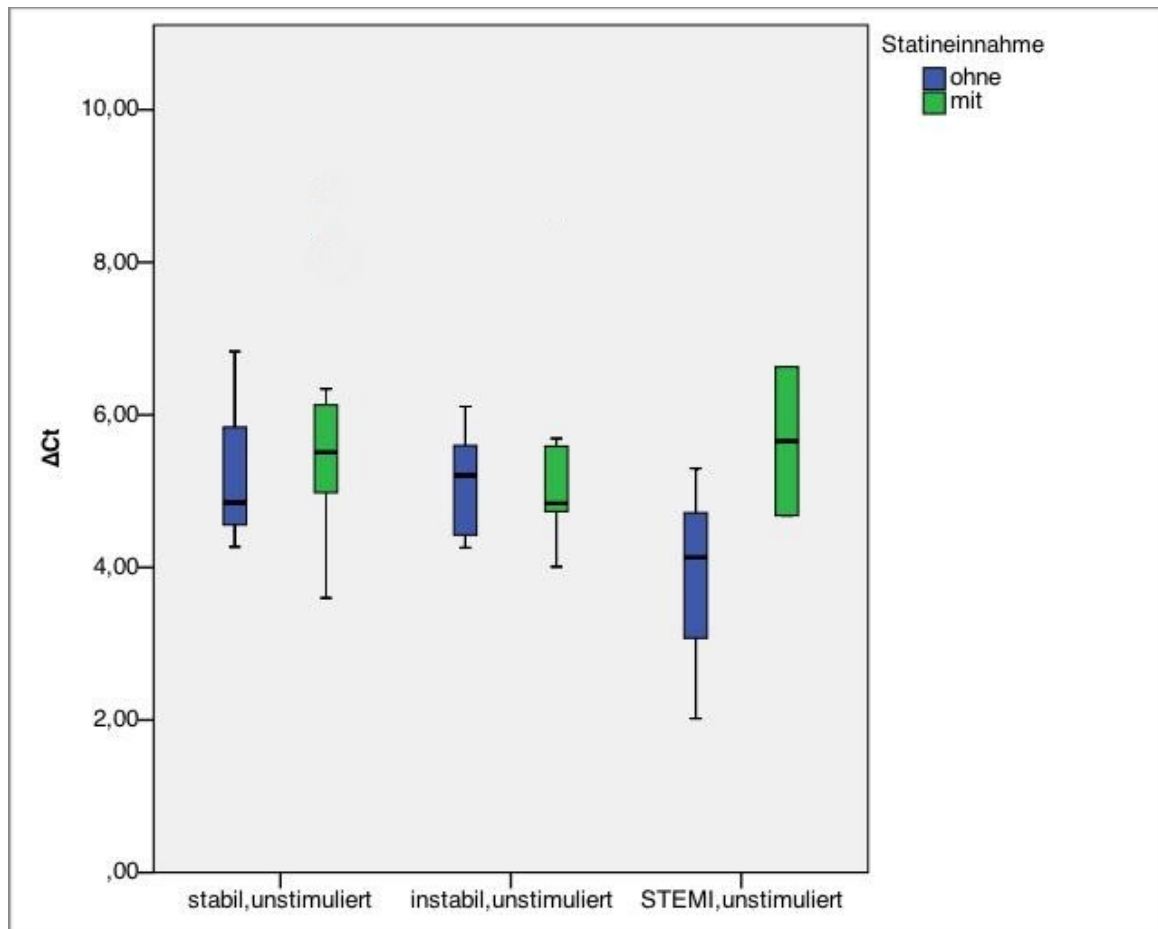


Abbildung 16: Unterschied der ICAM-1 Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

Stimulierte Zellen

Der Mittelwert der mit TNF α -stimulierten, aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit stabiler KHK ohne Statineinnahme betrug $4,44 \pm 1,15$, während er bei Patienten der gleichen Gruppe mit Statineinnahme $3,84 \pm 0,67$ betrug ($p < 0,05$).

Bei Patienten mit instabiler KHK ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $3,87 \pm 0,34$ und bei Patienten der gleichen Gruppe mit Statineinnahme betrug selbiger $4,06 \pm 1,01$. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p = 0,327$).

Bei der Gruppe mit STEMI berechnete sich ein Mittelwert von $4,08 \pm 0,35$ bei Patienten ohne Statineinnahme im Gegensatz zu einem Mittelwert von

4,12±0,15 bei Patienten mit Statineinnahme. Im T-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p=0,439).

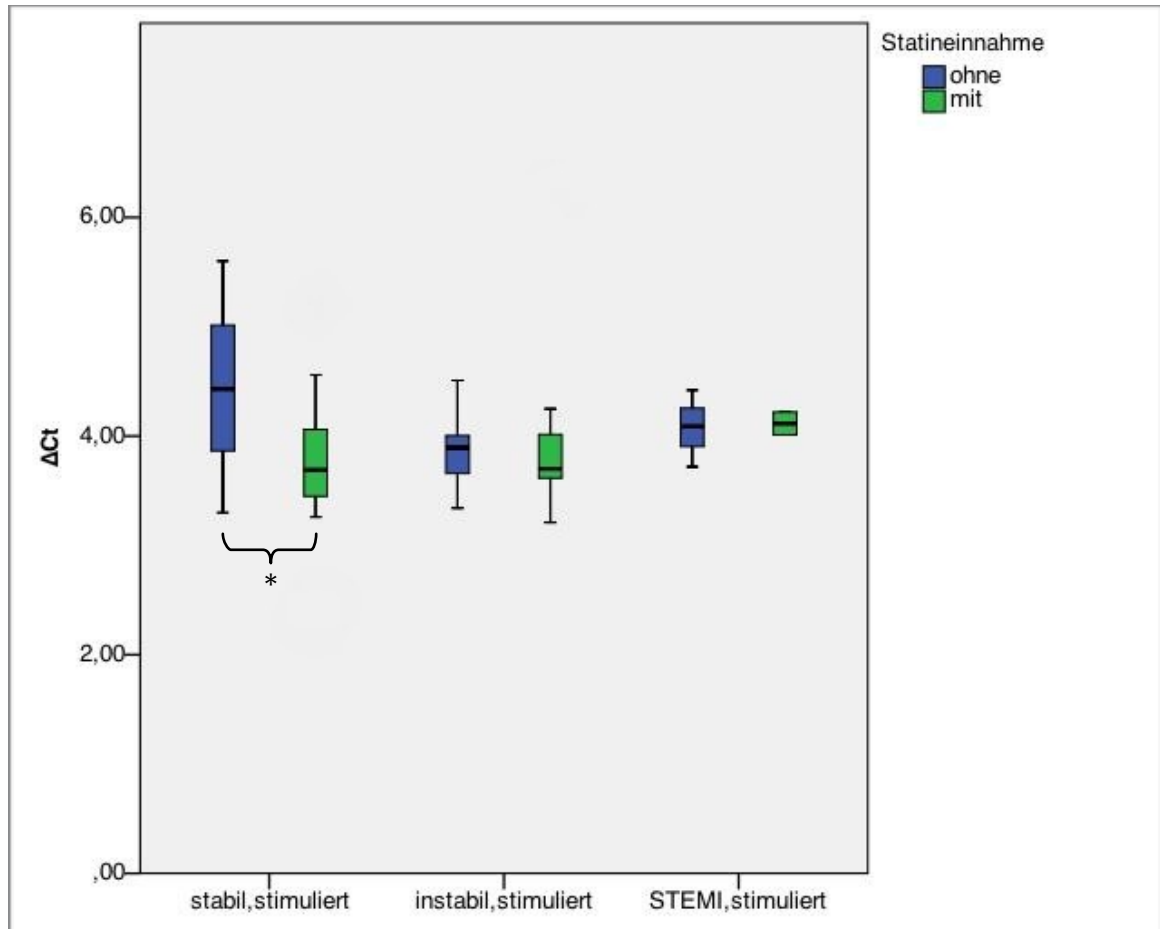


Abbildung 17: Unterschied der ICAM-1 Expression auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme, *p<0,05

Ausmaß der Steigerung nach Stimulation

Bei Patienten mit stabiler KHK zeigte sich nach Stimulation der aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen mit TNF α eine Steigerung der ICAM-1 Expression um das $1,88 \pm 0,51$ fache im Gegensatz zur Steigerung um das $3,89 \pm 2,24$ fache, wenn die Patienten ein Statin einnahmen. Der Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,146$).

Bei Patienten mit instabiler KHK zeigte sich eine $2,53 \pm 1,02$ fache Steigerung ohne Statineinnahme, im Gegensatz zu einer $2,77 \pm 1,11$ fachen Steigerung bei Statineinnahme. Dieser Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,670$).

Bei Patienten mit STEMI gab es nach Stimulation mit TNF α eine Steigerung auf das $1,15 \pm 1,04$ fache. Bei Patienten mit Statineinnahme zeigte sich eine $3,76 \pm 3,37$ fache Steigerung. Der Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,248$).

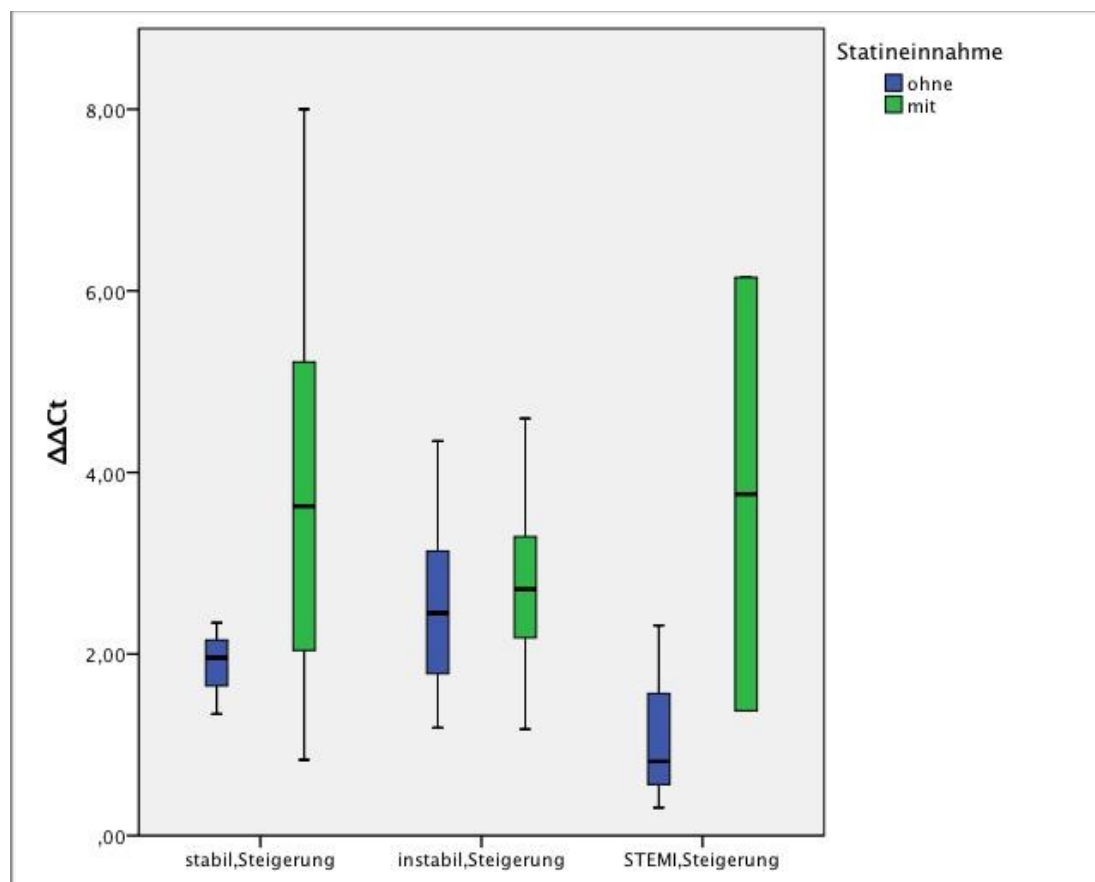


Abbildung 18: Ausmaß der Steigerung der ICAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

VCAM-1

Unstimulierte Zellen

Es wurden die Mittelwerte der mRNA-VCAM-1 Expression in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC berechnet und verglichen. Bei Patienten mit stabiler KHK ohne Statineinnahme wurde ein Mittelwert von $12,99 \pm 0,19$, bei Patienten der gleichen Gruppe mit Statineinnahme ein Mittelwert von $13,33 \pm 1,71$ berechnet. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,218$).

Bei Patienten mit instabiler KHK berechnete sich ein Mittelwert von $12,02 \pm 0,99$ bei Patienten ohne Statineinnahme, bei Patienten mit Statineinnahme betrug er $13,63 \pm 1,65$. Die VCAM-1 Expression bei instabiler KHK ohne Statineinnahme war im T-Test signifikant höher als bei Patienten mit Statineinnahme ($p<0,05$).

Bei Patienten mit STEMI und ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $12,08 \pm 1,37$, bei Patienten mit Statineinnahme $14,36 \pm 1,76$. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,136$).

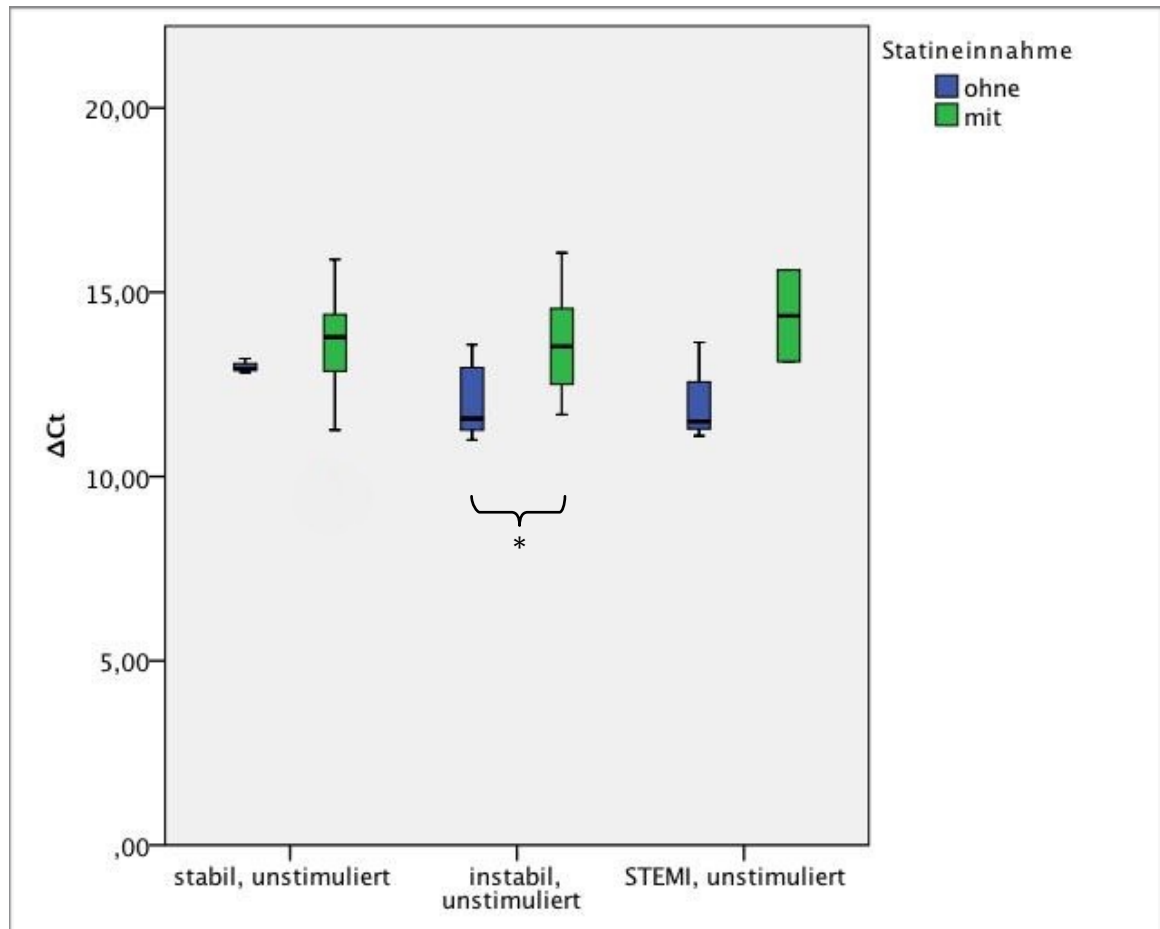


Abbildung 19: Unterschied der VCAM-1-Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme; *p<0,05

Stimulierte Zellen

Bei Patienten mit stabiler KHK ohne Statineinnahme berechnete sich ein Mittelwert von $11,87 \pm 1,35$, bei Patienten mit Statineinnahme betrug er $11,53 \pm 1,90$. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,364$).

Bei Patienten mit instabiler KHK ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $9,88 \pm 1,20$, bei Patienten mit Statineinnahme betrug er $11,45 \pm 1,87$. Hier zeigte sich im T-Test ein signifikanter Unterschied und damit eine höhere Expression von VCAM-1 ohne Statineinnahme ($p<0,05$).

Bei Patienten mit STEMI ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $10,61 \pm 2,10$, bei Patienten mit Statineinnahme betrug er $11,09 \pm 1,12$. Der T-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,382$).

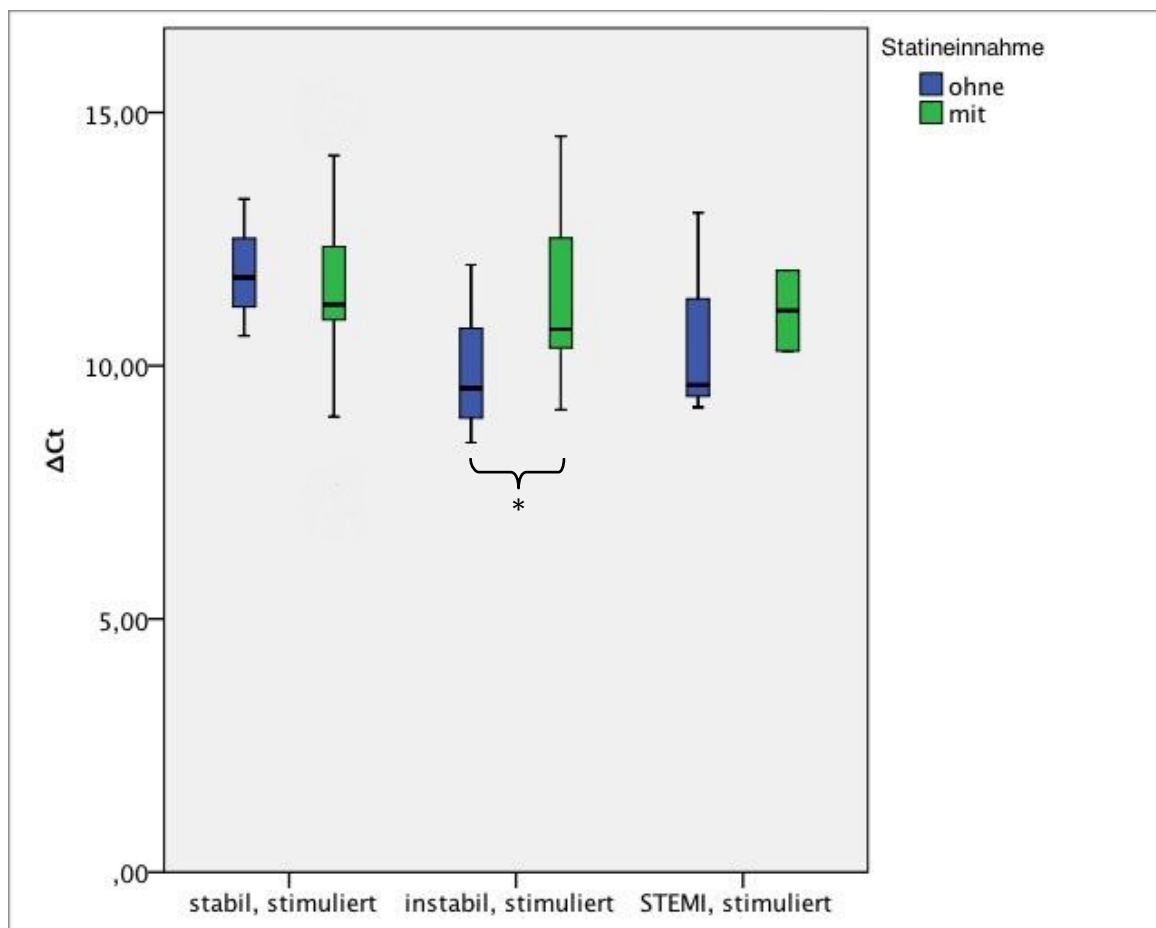


Abbildung 20: Unterschied der VCAM-1-Expression auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme; * $p<0,05$

Ausmaß der Steigerung nach Stimulation

Bei Patienten mit stabiler KHK zeigte sich eine Steigerung der VCAM-1 Expression nach Stimulation mit TNF α um das $2,75 \pm 1,97$ fache, wenn die Patienten kein Statin einnahmen. Bei Statineinnahme zeigte sich eine Steigerung um das $4,61 \pm 3,56$ fache.

Bei Patienten mit instabiler KHK zeigte sich eine $5,58 \pm 5,19$ fache ohne Statineinnahme im Gegensatz zu einer $5,69 \pm 3,72$ fachen Steigerung mit Statineinnahme.

Bei Patienten mit STEMI war eine $3,10 \pm 1,73$ fache Steigerung ohne Statineinnahme im Gegensatz zu einer $10,14 \pm 4,29$ fachen Steigerung mit Statineinnahme erkennbar.

Im Median-Test zeigte sich zwischen den Gruppen keine Signifikanz ($p=0,643$).

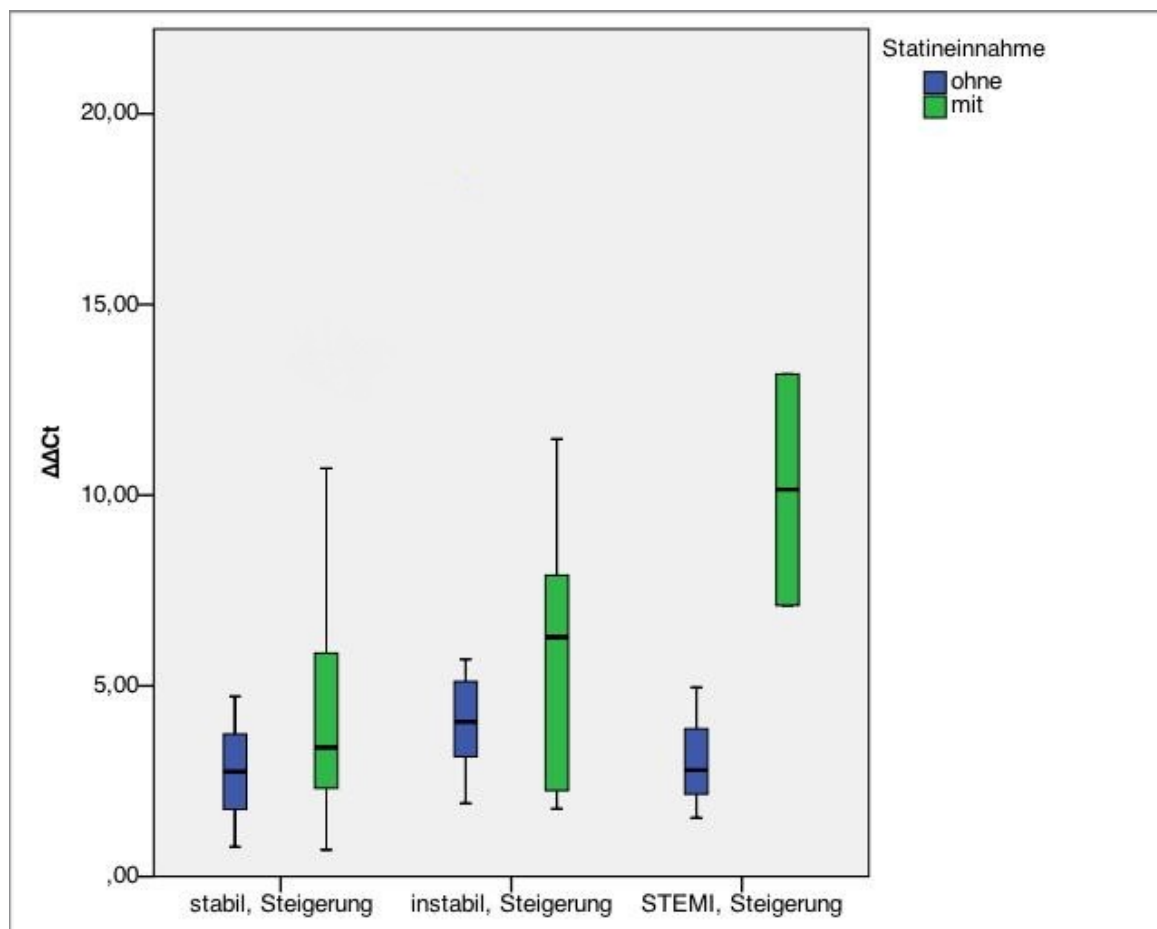


Abbildung 21: Ausmaß der Steigerung der VCAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

CD80

Es wurden die Mittelwerte der mRNA-CD80 Expression in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺Zellen berechnet und verglichen. Bei Patienten mit stabiler KHK ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $11,09 \pm 0,79$, bei Patienten der gleichen Gruppe mit Statineinnahme betrug er $11,63 \pm 1,38$. Der Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,458$).

Bei den Patienten mit instabiler KHK ergab sich ein Mittelwert der CD80 Expression von $12,21 \pm 1,04$ ohne Statineinnahme, bzw. $11,35 \pm 0,50$ mit Statineinnahme. Der Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,096$). Bei der Gruppe der Patienten mit STEMI wurde ein Mittelwert von $12,02 \pm 0,96$ bei Patienten ohne Statineinnahme, bzw. $11,37 \pm 2,11$ bei Patienten mit Statineinnahme berechnet. Der Unterschied war im T-Test nicht signifikant ($p=0,655$).

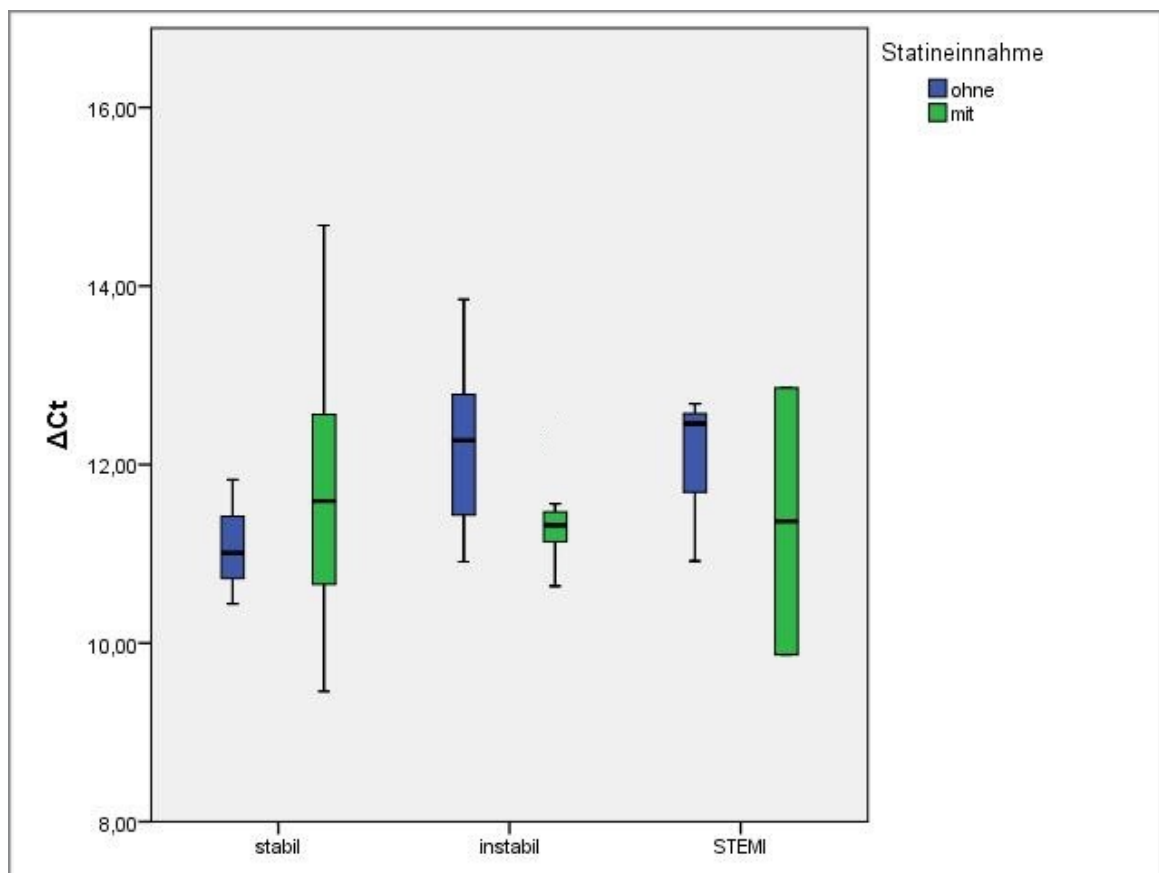


Abbildung 22: Unterschied der CD80-Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

CD86

Der Mittelwert der mRNA CD86 Expression in Zellen von Patienten mit stabiler KHK ohne Statineinnahme betrug $5,25 \pm 0,36$, bei Patienten mit Statineinnahme betrug er $4,85 \pm 0,79$. Der Unterschied war im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant ($p=0,634$).

Bei Patienten mit instabiler KHK ohne Statineinnahme betrug der Mittelwert $5,69 \pm 0,28$, bei Patienten mit instabiler KHK mit Statineinnahme $5,59 \pm 0,26$. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,848$).

Bei Patienten mit STEMI betrug der Mittelwert in der Gruppe ohne Statineinnahme $5,92 \pm 0,62$ und in der Gruppe mit Statineinnahme $5,50 \pm 0,21$. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Mann-Whitney-U-Test ($p=0,248$).

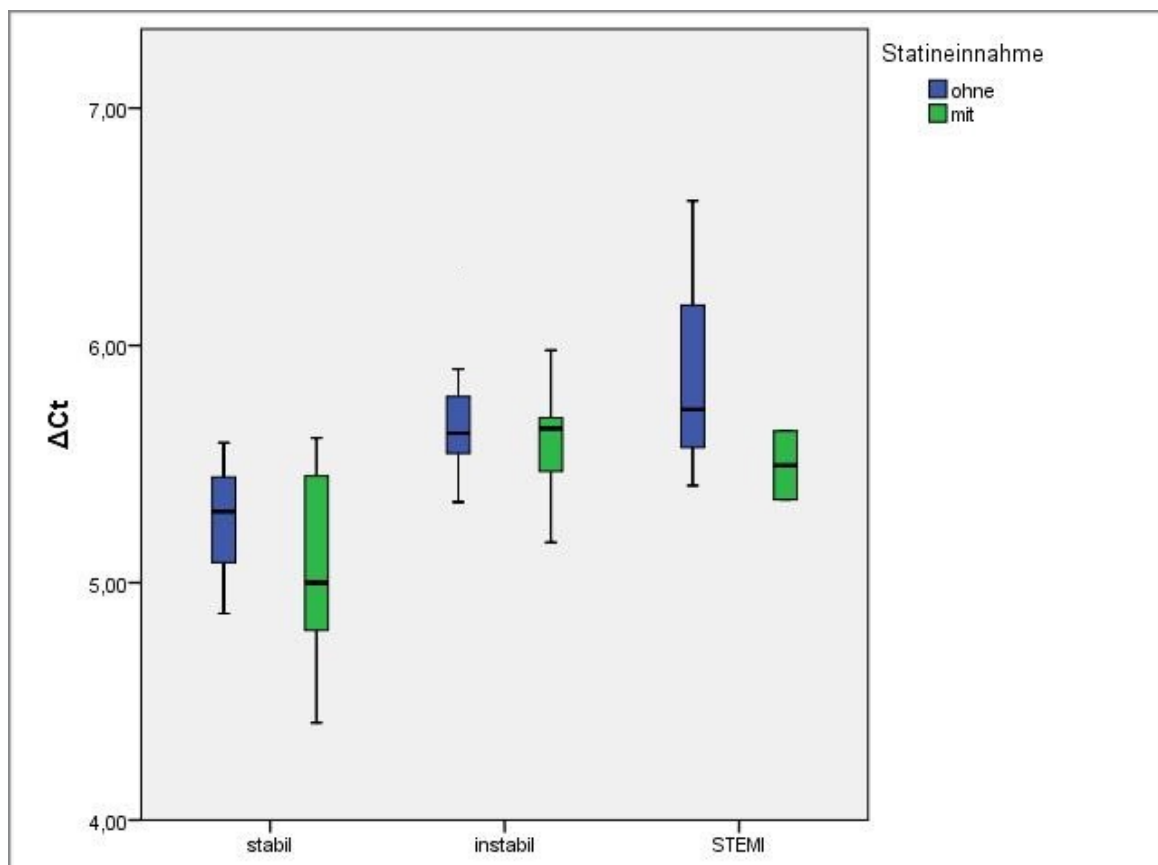


Abbildung 23: Unterschied der CD86-Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

5. Diskussion

Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen wurden zuerst 1997 als CD34⁺Zellen charakterisiert. Ihnen wurde die Möglichkeit der Differenzierung in Endothelzellen zugeschrieben und postuliert, sie stellten eine gezielte Möglichkeit des Körpers dar, an Orten der Gefäßschädigung aktiv eine Reendothelialisierung zu fördern. Seit bekannt ist, dass die klassischen Risikofaktoren der KHK, wie Hypertonus, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie die Menge der im Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen herabsetzen [40, 41, 47], hat die experimentelle und klinische Forschung über EPC weitere Bedeutung erlangt. Neben den Studien, die sich mit reduzierter oder erhöhter Zellzahl bei pathologischen oder protektiven Prozessen beschäftigen [40-42, 44, 46, 47, 70], begannen sich einige Arbeitsgruppen mit der tatsächlichen Funktion der Zellen auseinanderzusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass zirkulierende CD34⁺ EPC eine Ausdifferenzierung in mature Endothelzellen und somit eine wichtige physiologische Grundlage für die Reendothelialisierung nach Verletzung der Gefäßwand darstellen [71]. Im Ischämiemodell bei Tieren konnte der Einfluss von CD34⁺ EPC nach Injektion bzw. Transfusion auf das Ausmaß des Ischämieareals überprüft werden [23-25, 72]. Die akkumulierten Ergebnisse legen nahe, dass sowohl bei Ischämien von Gliedmaßen, als auch bei myokardialen Ischämien die Transfusion von CD34⁺ EPC zu verbesserter Neovaskularisierung, größerer Kapillardichte und verringerter Infarktgröße mit verbesserter postinterventioneller Funktion im ischämischen Areal führt. Auch in klinischen Studien zur intrakoronaren Transfusion von CD34⁺ EPC bei Patienten nach myokardialen Ischämien konnte gezeigt werden, dass die Behandlung zu verbesserter linksventrikulärer Funktion im Sinne von verbesserter Ejektionsfraktion, verringertem enddiastolischen Volumen und kleinerem Narbenareal, führt [57, 73]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei Menschen mit kardiovaskulären Risikofaktoren eine hohe Zahl von im peripheren Blut zirkulierenden CD34⁺ EPC vor kardiovaskulärem Tod ($p=0,001$),

erstmaligen Myokardinfarkten ($p=0,002$), Revaskularisationen ($p=0,02$) und Hospitalisierung ($p=0,01$) schützt [74].

In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Immunsystems einen Einfluss auf die beobachteten Studienergebnisse hatte. TNF α , eines der wichtigsten Zytokine des Immunsystems [75], ist entscheidend an der Rekrutierung immunologischer Zellen beteiligt [76], weswegen überprüft wurde, ob die Einnahme von TNF α -Antagonisten eine Änderung der Menge der CD34⁺ EPC bewirkt. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der Anzahl der im Blut zirkulierenden CD34⁺ EPC bei Therapie mit TNF α -Antagonisten [77].

Von Calza et al. konnte gezeigt werden, dass Statintherapie zu einer geringeren TNF α -Menge im Blut führt [78, 79]. Statine (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) haben pleiotrope Wirkungen. Neben ihrer LDL-senkenden Wirkung, senken Statine das Gesamtcholesterin und die Apolipoproteine B, C-II, C-III, und E und erhöhen die Konzentration des protektiv wirkenden HDL-Cholesterins [80]. Sie reduzieren die Inflammation der atherosklerotischen Intima [50] und, die für unsere Studie wohl relevanteste Tatsache, erhöhen die Anzahl zirkulierender CD34⁺ EPC im peripheren Blut von Patienten mit stabiler KHK. Dies wurde unter anderem von Vasa et al. anhand einer prospektiven Patientenstudie gezeigt [68, 81]. Fünfzehn Patienten mit stabiler KHK erhielten hierbei vier Wochen lang 40mg Atorvastatin pro Tag. Nach vier Wochen konnte ein fast dreifacher Anstieg zirkulierender CD34⁺ EPC im Blut nachgewiesen werden. Erhöhte Zellzahlen und erhöhte funktionelle Aktivität von CD34⁺ EPC (vermittelt über Hochregulation des PI3/Akt-Signalweges) unter Statintherapie konnten zuvor bereits in vitro und im Mausmodell nachgewiesen werden [34, 67].

Neben all den Studien, die vermuten lassen, dass CD34⁺ EPC an der Regeneration geschädigten Endothels nach ischämischen Ereignissen beteiligt sind, gibt es auch jene, die einen negativen Effekt von EPC auf die Progression atherosklerotischer Prozesse zeigen. Zum Beispiel konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass die Injektion von aus dem Knochenmark entnommenen und ex vivo kultivierten EPC zu größeren und instabileren Plaques führt [82] und dass die Injektion mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark oder hämatopoetischer Stammzellen unter anderem durch Ausdifferenzierung in glatte Muskelzellen eine verstärkte Atherosklerose in Sinne größerer und instabilerer Plaques bewirken kann [83-85]. Aufgrund dieser diskrepanten Befundlage stellt sich die Frage, warum EPC im Falle einer Ischämie protektiv wirken können, während im nicht-ischämischen Modell gegenteilige Prozesse gezeigt werden konnten. Da das immunologische Milieu zwischen den beiden Modellen divergiert, ist möglicherweise hier die Ursache für diese Erkenntnisse zu suchen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in vorhergehenden in vitro und in vivo Studien zeigen, dass für das immunologische Verhalten von Endothelzellen der Zell-Matrix-Kontakt von entscheidender Bedeutung ist: So weisen CD31⁺ Endothelzellen als frei zirkulierende Zellen im Gegensatz zu matrix-adhärenenten CD31⁺ Endothelzellen eine sehr viel stärkere immunologische Aktivität auf [61, 86]. Die Freisetzung von Endothelzellen aus der Bindung an die subendotheliale Basalmembran geht mit einer erhöhten Expression von Adhäsionsproteinen und HLA, sowie einer veränderten Zytokinproduktion und einer Veränderung ihrer Thrombogenität einher [7]. Daneben führen auch Veränderungen in der Zusammensetzung der subendothelialen Basalmembran allein zu Veränderungen der endothelialen Immunogenität. Diese Phänomene konnten analog auch für epitheliale Zellen, sowie für Endothelzellen im Bereich des Knochenmarks gezeigt werden [87, 88].

Es interessierte uns daher, ob im peripheren Blut zirkulierende endotheliale Progenitorzellen in Analogie zu ausgereiften, von der Matrix gelösten

Endothelzellen eine immunologische Aktivität aufweisen. Da andere Arbeitsgruppen einen Effekt von Statinen auf die Zahl und reparative Eigenschaft von endothelialen Progenitorzellen zeigen konnten [34, 67, 69] und uns u.a. durch eigene Vorarbeiten hinlänglich bekannt ist, dass Statine über ihre pleiotropen Eigenschaften in die Immunantwort modulierend einwirken können [89], untersuchten wir bei Patienten mit verschiedenen Stadien der koronaren Herzerkrankung die mRNA-Expression von immunologisch bedeutsamen Oberflächenmolekülen wie HLA-DR, CD80, CD86, ICAM-1 und VCAM-1 in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC und verglichen die Ergebnisse bei Patienten mit und ohne Statineinnahme. Des Weiteren führten wir eine Messung der TNF α -Konzentration im peripheren Blut bei verschiedenen Stadien der KHK durch und stimulierten die aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC mit TNF α um eine Änderung der Zellfunktion bei immunologischer Aktivität zu untersuchen. Zudem wurde der Effekt von IFN γ auf endotheliale Progenitorzellen untersucht, da auch für dieses pro-inflammatorische Zytokin ein Einfluss auf den endothelialen Immunphänotyp gezeigt werden konnte [17, 61]. Die bisherigen Versuche zu diesem Thema wurden mit Hilfe ex-vivo kultivierter EPC oder EPC, die durch induktive Zytokine aus dem Knochenmark ausgeschwemmt wurden, durchgeführt [90]. Ob diese Zellen jedoch den in vivo vorkommenden im peripheren Blut zirkulierenden CD34⁺ EPC entsprechen, wurde bisher nicht untersucht. Daher haben wir bewusst die isolierten Zellen nicht kultiviert, sondern sofort nach Isolation aus dem peripheren Blut die RNA der CD34⁺ Zellen isoliert, um die in vivo vorkommenden Bedingungen am exaktesten darzustellen.

Um die verschiedenen Stadien der KHK bezüglich ihrer immunologischen Aktivität zu unterscheiden, überprüften wir die Höhe der TNF α -Konzentration im Serum von Patienten der verschiedenen Gruppen. Hierbei konnte die signifikant höchste TNF α -Konzentration im Serum von Patienten mit instabiler KHK gezeigt werden, was ein verstärkt entzündliches Milieu im Rahmen von ischämischen Ereignissen im Sinne von akuten Koronarsyndromen und STEMI nahelegt, während bei stabiler KHK als nicht ischämischer Prozess eine niedrigere Immunogenität vorliegt. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer und unserer eigenen Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass sich die höchste T-Zell- [91], sowie Monozyten- [92] Aktivität bei Patienten mit instabiler KHK findet. Im Folgenden überprüften wir weiterhin ob die Genexpression der untersuchten Oberflächenmoleküle sich durch Stimulation mit TNF α weiter steigern lässt, oder ob die Genexpression unabhängig davon ist.

Wir konnten durch unsere Versuche zeigen, dass CD34⁺ EPC CD80 und CD86 exprimieren. Der CD28/CD80/CD86-Signalweg stellt einen sehr wichtigen kostimulatorischen Signalweg für die T-Zell-Aktivierung durch verschiedene Zellen dar [61, 93]. Dieser Signalweg konnte neben professionellen antigen-präsentierenden Zellen (z.B. dendritischen Zellen) und sogenannten semi-professionellen antigen-präsentierenden Zellen auch für CD31⁺ Endothelzellen gezeigt werden [17].

CD86 wurde bei Patienten mit stabiler KHK hierbei signifikant höher exprimiert als bei gesunden Probanden und höher als bei Patienten mit instabiler KHK und STEMI. Die CD80-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. In unserer Kohorte zeigte sich anhand der Δ Ct-Werte über alle Gruppen hinweg die Expression von CD86 durch CD34⁺ EPC insgesamt sehr viel höher als diejenige von CD80.

Die Expression beider Moleküle konnte dabei weder durch Stimulation mit TNF α noch durch Stimulation mit IFN γ signifikant moduliert werden, was im Gegensatz zur Steigerung der Expression kostimulatorischer Moleküle durch Zytokine auf CD31⁺ maturen Endothelzellen steht [17, 86]. Deshalb stellen wir die Vermutung auf, dass die Expression von CD80 und CD86 auf CD34⁺ EPC TNF α - und IFN γ - unabhängig reguliert wird oder die Expression von CD80 und CD86 auf aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC bei dem von uns untersuchten Patientenkollektiv bereits in vivo maximal stimuliert ist, was allerdings vor allem für die Gruppe der gesunden Probanden, insbesondere im Hinblick auf die geringe TNF α -Konzentration im Serum, sehr unwahrscheinlich erscheint.

ICAM-1 ist entscheidend an der Migration von CD34⁺ EPC in ischämisches Gewebe beteiligt. Wu et al. konnten im Jahr 2006 durch CD18-Blockade im Mausmodell zeigen, dass von Endothelzellen exprimiertes ICAM-1 entscheidend an der Rekrutierung von CD34⁺ EPC beteiligt ist [94]. In den Mäusen mit CD18-Blockade konnten CD34⁺ EPC nach Infarkt signifikant weniger in das geschädigte Myokard einwandern. In dieser Veröffentlichung ist ICAM-1 nur als endotheliales Oberflächenmolekül beschrieben, welches CD34⁺ EPC durch deren ICAM-1 bindendes Oberflächenmolekül CD18, adhäriert. Dieses Ergebnis wird auch von Yoon et al. im Tiermodell gezeigt werden: ICAM-1-Blockade führte zu einer verminderten Migration von CD34⁺ EPC in ischämisches Gewebe [95]. Bogolovsky et al. beschrieben in einer Veröffentlichung von 2011, dass die erniedrigte Anzahl CD34⁺ EPC bei Patienten mit akutem ischämischen Hirninfarkt mit erhöhten gelösten ICAM-1-Werten im Serum der Patienten einher geht [96]. Da aktivierte humane Endothelzellen ICAM-1 produzieren [97], folgerten die Verfasser der Studie, dass gelöstes ICAM-1 hauptsächlich mit der Funktion der Endothelzellen korreliert. Dies kann pathophysiologisch unter anderem die Migration von EPC anregen. Wir konnten nun zusätzlich zeigen, dass CD34⁺ EPC selbst eine hohe Genexpression von ICAM-1 zeigen. Diese Expression kann unter Stimulation mit TNF α , also z.B. im akut entzündlichen Geschehen, zusätzlich gesteigert

werden. Die erhöhte Genexpression von ICAM-1 mRNA in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC geht möglicherweise mit einer konsekutiv erhöhten Expression von ICAM-1 als Oberflächenmolekül einher. Da ICAM-1 als proinflammatorisches Adhäsionsmolekül an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist [18], ist denkbar, dass CD34⁺ endotheliale Progenitorzellen ebenso wie Endothelzellen in der Lage sind nach Inkorporation eine Immunantwort in der Gefäßwand zu initiieren und zu unterhalten. Die geringste ICAM-1-Grundexpression zeigte die Gruppe der Patienten mit stabiler KHK, die höchste zeigte die Gruppe der Patienten mit STEMI. Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nur zwischen der Gruppe der stabilen KHK und der Gruppe der gesunden Probanden. Die Stimulation mit TNF α führte nur bei den Patienten mit STEMI nicht zu einer signifikanten Steigerung der ICAM-1-Expression. Bei gesunden Probanden und den Gruppen mit stabiler und instabiler KHK führte die Stimulation mit TNF α zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression. Nach Stimulation bestand kein signifikanter Unterschied mehr in der Expression von ICAM-1 zwischen den verschiedenen Untergruppen. Wir verglichen das Ausmaß der Hochregulation von ICAM-1-RNA nach Stimulation mit TNF α , mit der in vivo Serumkonzentration von TNF α in den unterschiedlichen Patientengruppen. Es zeigte sich keine direkte Korrelation der TNF α -Konzentration in vivo mit dem Ausmaß der Hochregulation nach ex vivo Stimulation. Eine signifikant erhöhte TNF α -Konzentration bei Patienten mit instabiler KHK geht unserer Daten nach mit einer verringerten Möglichkeit der Hochregulation der ICAM-1-Expression einher. Es ist denkbar, dass eine bereits in vivo erhöhte Konzentration mit einer verringerten Steigerungsfähigkeit durch eine erneute Stimulation korreliert, da die CD34⁺ EPC bereits in vivo stärker aktiviert sind, als CD34⁺ EPC der Patienten mit stabiler KHK oder gesunden Probanden.

Neben ICAM-1 wurde auch VCAM-1 als Oberflächenmolekül, welches zur TNF α -induzierten Migration und Adhärenz von T-Zellen und Monozyten an Endothelzellen führt [98], überprüft. Im Tiermodell und in humanen Gewebeproben konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen in

atherosklerotisch veränderten Gefäßabschnitten verstärkt VCAM-1 exprimieren [19, 21, 22, 99]. Wir überprüften nun die Genexpression von VCAM-1 in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC. Es konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied in der VCAM-1 Expression zwischen den verschiedenen Gruppen besteht. Stimulation der CD34⁺ EPC mit TNF α bewirkte eine signifikante Steigerung der VCAM-1-Expression in allen Gruppen. Auch hier verglichen wir die Hochregulation der VCAM-1-Expression nach ex vivo TNF α -Stimulation mit der Serumkonzentration von TNF α . Es konnte keine direkte Korrelation gezeigt werden, jedoch besteht eine Tendenz zur höheren Hochregulation bei erhöhten TNF α -Konzentrationen und somit potenziell bereits in vivo stärker aktivierten Zellen. In unserer Kohorte zeigte sich analog zu CD80/86 anhand der Δ Ct-Werte über alle Gruppen hinweg die Expression von ICAM-1 durch CD34⁺ EPC insgesamt sehr viel höher als diejenige von VCAM-1. Wie Endothelzellen [7] haben auch CD34⁺ EPC sehr viel mehr Aktivatoren als TNF α [56], was ein möglicher Grund dafür ist, weshalb wir keine direkte Korrelation von erhöhten TNF α -Werten bei instabiler KHK mit der Expression der Oberflächenmoleküle oder deren Hochregulation darstellen konnten. Dies gilt sowohl für die Expression von ICAM-1 als auch für die Expression von VCAM-1.

Zusammenfassend zeigen aus dem peripheren Blut isolierte CD34⁺ endotheliale Progenitorzellen eine Genexpression von Markern, welche bei Endothelzellen an der T-Zell- und Monozyten-Migration beteiligt sind [98]. Ob sich unsere auf genetischer Ebene erhobenen Daten in funktionelle Unterschiede der EPC übersetzen lassen, müssen weitere Untersuchungen erweisen: So stellt sich zum Beispiel die Frage, ob eine unterschiedliche Genexpression von CD80/CD86 bzw. ICAM-1 und VCAM-1 zu einer unterschiedlichen Oberflächenexpression dieser Moleküle auf CD34⁺ EPC führt und anschließend, ob sich durch die unterschiedliche Oberflächenexpression eine pathophysiologische Konsequenz auf die Aktivierung von Immunzellen ergibt.

Ein weiteres Ergebnis unserer Experimente ist, dass aus dem peripheren Blut isolierte CD34⁺ EPC eine hohe Genexpression von HLA-DR aufweisen. Als Oberflächenmarker antigenpräsentierender Zellen ist HLA-DR seit Langem bekannt. Über HLA erfolgt die Präsentation von Antigenen an T-Zellen. Eine Aktivierung von Zellen der immunologischen Effektorantwort bedarf einer zusätzlichen Bindung von kostimulatorischen Molekülen an entsprechende Liganden auf der entsprechenden Effektorzelle. Auch für mature Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass sie HLA-DR exprimieren [100]. Dabei ist die HLA-DR Expression abhängig von der Größe der Arterien und ist möglicherweise in großen Gefäßen reduziert [101]. Bei ex vivo kultivierten Endothelzellen verschwand die Möglichkeit dieser Zellen, HLA-DR zu exprimieren, konnte aber durch Stimulation der Zellen mit humanem IFN γ wieder angeregt werden [102, 103]. Wir konnten nun eine hohe Genexpression von HLA-DR in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC nachweisen. In unseren Versuchen zeigte sich kein Unterschied zwischen nicht stimulierten und stimulierten Zellen, insbesondere fand sich auch nach Stimulation mit IFN γ kein Unterschied. Die Expression war in allen Untergruppen ähnlich hoch. Auch wenn wir die Oberflächenexpression nicht untersucht haben, kann unser Ergebnis einer hohen HLA-DR-Expression auf CD34⁺ EPC einen weiteren Hinweis liefern, dass es sich bei CD34⁺ EPC um immunologisch aktive, gegebenenfalls auch antigenpräsentierende Zellen handeln könnte, die möglicherweise selbst an der Initiierung und Aufrechterhaltung entzündlicher Reaktionen, wie zum Beispiel im Rahmen einer koronaren Herzerkrankung, beteiligt sein können.

Da Statine wie bereits zuvor erläutert einen Einfluss auf die Konzentration und Funktion von CD34⁺ EPC im peripheren Blut haben [34, 81, 104] und einige der Patienten unserer Kohorte zum Zeitpunkt der Probengewinnung ein Statin einnahmen, verglichen wir zusätzlich die mRNA-Expression der Oberflächenmoleküle in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC von Patienten mit und ohne Statineinnahme. Bei TNF α stimulierten Zellen war die

ICAM-1-Expression bei Patienten mit stabiler KHK ohne Statineinnahme signifikant geringer als bei Patienten mit stabiler KHK mit Statineinnahme. Die Ergebnisse der anderen Gruppen zeigten jedoch eher eine -nicht signifikante-Tendenz in die andere Richtung, das heißt, dass Patienten mit Statineinnahme eine geringere ICAM-1-Expression in aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC aufweisen als Patienten ohne Statinvorbehandlung.

Bezüglich der Steigerung der TNF α -induzierten Expression von ICAM-1 bei den verschiedenen Gruppen mit und ohne Statineinnahme zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Veränderungen zeigten aber eine -nicht signifikante- Tendenz in die gleiche Richtung; Die Expression von ICAM-1 bei Patienten mit Statineinnahme scheint durch Stimulation mit TNF α stärker anzusteigen, als bei statin-naiven Patienten.

Die Expression von VCAM-1 war bei Patienten mit Statineinnahme in der Gruppe der instabilen KHK signifikant geringer. Die anderen Gruppen zeigten eine Tendenz in die gleiche Richtung. Die Steigerung der Expression von VCAM-1 durch Stimulation mit TNF α war höher, wenn die Patienten ein Statin einnahmen. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Die Statinvorbehandlung der Patienten führt also zur erhöhten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 bei Stimulation mit TNF α , aber zu tendenziell geringeren Grundlevels der Expression von ICAM-1 und VCAM-1.

Hinsichtlich der CD80-Expression zeigte sich ebenso wie bei der CD86-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Statinvorbehandlung.

Vorangegangenen Studien konnten zeigen, dass die Zahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD34⁺ EPC unter Statintherapie ansteigt [34, 81]. Wir konnten nun ergänzend darstellen, dass die Genexpression der Oberflächenmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 durch Statintherapie tendenziell verringert wird, also der plaquestabilisierende [105, 106] und protektive Statin-Einfluss auf das Fortschreiten der KHK mit weniger stark immunaktivierten CD34⁺ EPC einhergehen könnte. Eine weitere Möglichkeit wie die geringere Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf CD34⁺ EPC zustande kommt ist, dass die TNF α -

Konzentration im Serum durch Statineinnahme verringert wird [78, 79] und es dadurch zu weniger stark in vivo stimulierten Zellen mit einer geringeren Genexpression der überprüften Marker kommt. Dass die Steigerung der Genexpression der untersuchten Oberflächenmoleküle durch Stimulation mit TNF α bei Patienten mit Statineinnahme verstärkt ist, mag ein weiteres Resultat der verringerten TNF α -Konzentration im Serum der Patienten sein. Eine verringerte Zellaktivität durch Statineinnahme führt also möglicherweise zur größeren Steigerbarkeit der Expression bei Stimulation mit TNF α .

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie zeigen, dass zirkulierende CD34⁺ EPC im inflammatorischen Milieu einer KHK ebenfalls Marker der Immunaktivierung auf mRNA-Ebene exprimieren und durch Stimulation mit TNF α , einem der wichtigsten Zytokine des Immunsystems [75], eine Expressionssteigerung von ICAM-1 und VCAM-1 erfahren. Entzündliche Veränderungen, unter anderem verbunden mit erhöhten TNF α -Werten, führen also nicht nur zur geringeren Anzahl im peripheren Blut zirkulierender EPC, sondern auch zur Steigerung der immunologischen Aktivität und möglicherweise zur Änderung der Immunfunktion dieser Zellen.

Limitation der Studie

Einschränkend muss beachtet werden, dass die jeweiligen Probanden-Gruppen relativ klein sind. Besonders bei der Aufteilung der Gruppe mit ACS in instabile KHK und STEMI oder bei der Aufteilung in Patienten mit und ohne Statineinnahme sind auf Grund sehr kleiner Gruppengrößen Überschätzungen durch starke Verzerrung nicht zu vernachlässigen. Des Weiteren ist als limitierend der Unterschied zwischen den gesunden Probanden und den anderen Gruppen zu beachten. Bezüglich des Alters, der Risikofaktoren und der Medikamentenanamnese zeigten sich hier signifikant unterschiedliche Patientenkollektive.

Eines der größten Probleme der Forschung mit wissenschaftlichen Untersuchungen mit endothelialen Progenitorzellen ist das Nichtvorhandensein einer eindeutigen Definition eben jener Zellen. Die anerkannten und am häufigsten durchgeführten Formen der Isolation von EPC sind die Identifikation der Zellen mittels fluoreszierender Antikörper oder die Isolation mittels Zellkultur [39, 107].

Da wir bei der Isolation unserer Zellen nur CD34 als Oberflächenmolekül und die Tatsache, dass die Zellen im peripheren Blutkreislauf zirkulieren, als definierende Elemente festgelegt hatten, besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den beobachteten Zellen nicht nur um EPC, sondern mehr um eine Mischung aus verschiedenen Zellen handelt und somit die erworbenen Informationen mit gewissen Einschränkungen betrachtet werden müssen. Andererseits wurden in unseren Versuchen nicht isolierte Zellen in Kultur gebracht und dann deren Verhalten im Verlauf in-vitro analysiert, sondern bewusst aus einer kleinen Anzahl von Zellen durch Isolation aus dem peripheren Blut eine ex-vivo Charakterisierung vorgenommen um dadurch am ehesten die in vivo herrschenden Bedingungen abzubilden. Zudem wurde die Studie bewusst mit menschlichen Blutproben durchgeführt, um eine größtmögliche Übertragbarkeit unserer Ergebnisse auf künftige Therapiemöglichkeiten ableiten zu können.

6. Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit mit ihren akuten Manifestationen und den daraus resultierenden Folgen ist immer noch die häufigste Todesursache in den Industrienationen. Umso wichtiger ist es, die Forschung nach Pathomechanismen dieser Krankheit zu vertiefen. Zuletzt standen endotheliale Progenitorzellen sowie deren funktionelles Verhalten insbesondere in Korrelation zu verschiedenen Risikofaktoren der KHK im Fokus der Wissenschaft. Wir haben uns nun in einer ersten Annäherung mit dem immunologischen Genotyp von aus dem peripheren Blut isolierten CD34⁺ EPC beschäftigt.

Mit der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass endotheliale Progenitorzellen selbst immunologisch aktive Zellen sind, welche abhängig vom Stadium der koronaren Herzkrankheit eines Individuums verschieden stark auf mRNA-Ebene Moleküle des Immunsystems exprimieren und somit möglicherweise aktiv an der Immunkaskade der koronaren Herzerkrankung beteiligt sein könnten. Zudem konnte ein Einfluss einer vorbestehenden Statintherapie auf die mRNA-Expression immunmodulatorischer Moleküle in Ruhe und bei Stimulation gezeigt werden.

In Zukunft müssen noch weitere Studien zur Frage der immunologischen Funktion der endothelialen Progenitorzellen in vivo durchgeführt werden, da die bisherigen Ergebnisse meist auf in vitro kultivierten oder durch Zytokin-Stimulation aus dem Knochenmark ausgeschwemmten Zellen basieren. Dazu wird die Frage nach einer eindeutigen Definition endothelialer Progenitorzellen und einer einheitlichen Isolation bzw. Charakterisierung der Zellen im Vordergrund stehen um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien zu ermöglichen und somit die Möglichkeit einer Verwendung der Kenntnisse im klinischen Alltag voranzutreiben.

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: klinische Charakteristika der Studienpopulation

Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Entstehung eines atherosklerotischen Plaques
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mobilisierung von EPC aus dem Knochenmark
- Abbildung 3: DNA-Sequenzen und spezifische Annealing-Temperaturen der Primer
- Abbildung 4: Beispielbild einer Immunfluoreszenzmikroskopie (blau: CD34⁺, grün: DAPI Zellkerne, runde Strukturen: Dynabeads)
- Abbildung 5: Expression von ICAM-1 auf unstimulierten CD34⁺Zellen
- Abbildung 6: Expression von ICAM-1 auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen
- Abbildung 7: Ausmaß der Steigerung der ICAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α
- Abbildung 8: Expression von VCAM-1 auf unstimulierten CD34⁺Zellen
- Abbildung 9: Expression von VCAM-1 auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen
- Abbildung 10: Ausmaß der Steigerung der VCAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α
- Abbildung 11: Expression von CD80 auf unstimulierten CD34⁺Zellen
- Abbildung 12: Expression von CD86 auf unstimulierten CD34⁺Zellen
- Abbildung 13: Serumkonzentrationen von TNF α
- Abbildung 14: Steigerung der ICAM-1-Expression verglichen mit der TNF α -Konzentration
- Abbildung 15: Steigerung der VCAM-1-Expression verglichen mit der TNF α -Konzentration
- Abbildung 16: Unterschied der ICAM-1 Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 17: Unterschied der ICAM-1 Expression auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 18: Ausmaß der Steigerung der ICAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 19: Unterschied der VCAM-1-Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 20: Unterschied der VCAM-1-Expression auf TNF α -stimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 21: Ausmaß der Steigerung der VCAM-1-Expression nach Stimulation der CD34⁺Zellen mit TNF α bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 22: Unterschied der CD80-Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme
- Abbildung 23: Unterschied der CD86-Expression auf unstimulierten CD34⁺Zellen bei Patienten mit und ohne Statineinnahme

Bibliografie

1. Roger, V.L., et al., Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2012. 125(1): p. 188-97.
2. Hamm, C.W., [Guidelines: Acute coronary syndrome (ACS). II: Acute coronary syndrome with ST-elevation]. *Z Kardiol*, 2004. 93(4): p. 324-41.
3. Hamm, C.W., [Guidelines: acute coronary syndrome (ACS). 1: ACS without persistent ST segment elevations]. *Z Kardiol*, 2004. 93(1): p. 72-90.
4. Windecker, S., et al., 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur Heart J*, 2014. 35(37): p. 2541-619.
5. Ollenschläger, G., M. Leigemann, and I. Kopp, [The German Program for Disease Management Guidelines: CHD Guideline 2006. Short review]. *Med Klin (Munich)*, 2006. 101(12): p. 993-8.
6. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
7. Pober, J.S., Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology. Am J Pathol*, 1988. 133(3): p. 426-33.
8. D'Anastasio, C., et al., Antibodies against monocytes and endothelial cells in the sera of patients with atherosclerotic peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 1988. 74(1-2): p. 99-105.
9. Doukas, J., G. Majno, and J.P. Mordes, Anti-endothelial cell autoantibodies in BB rats with spontaneous and induced IDDM. *Diabetes*, 1996. 45(9): p. 1209-16.
10. Meroni, P., et al., Humoral autoimmunity against endothelium: theory or reality? *Trends Immunol*, 2005. 26(5): p. 275-81.
11. Hansson, G.K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005. 352(16): p. 1685-95.
12. Napoli, C., et al., Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede

monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 1997. 100(11): p. 2680-90.

13. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 868-74.
14. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
15. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
16. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*, 1986. 314(8): p. 488-500.
17. Pober, J.S. and G. Tellides, Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol*, 2012. 33(1): p. 49-57.
18. Couffinhal, T., et al., Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1994. 74(2): p. 225-34.
19. Li, H., et al., An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb*, 1993. 13(2): p. 197-204.
20. Fotis, L., et al., Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *In Vivo*, 2012. 26(2): p. 243-50.
21. O'Brien, K.D., et al., Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation*, 1996. 93(4): p. 672-82.
22. Khan, B.V., et al., Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 1995. 95(3): p. 1262-70.
23. Kalka, C., et al., Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(7): p. 3422-7.
24. Kawamoto, A., et al., Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001. 103(5): p. 634-7.

25. Asahara, T., A. Kawamoto, and H. Masuda, Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells*, 2011. 29(11): p. 1650-5.
26. Rafii, S. and D. Lyden, Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 2003. 9(6): p. 702-12.
27. Werner, N., et al., Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*, 2003. 93(2): p. e17-24.
28. Losordo, D.W., et al., Intramyocardial, autologous CD34⁺ cell therapy for refractory angina. *Circ Res*, 2011. 109(4): p. 428-36.
29. Fadini, G.P., D. Losordo, and S. Dimmeler, Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res*, 2012. 110(4): p. 624-37.
30. Asahara, T., et al., Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997. 275(5302): p. 964-7.
31. Peichev, M., et al., Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34⁽⁺⁾ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000. 95(3): p. 952-8.
32. Urbich, C. and S. Dimmeler, Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 2004. 95(4): p. 343-53.
33. Vasa, M., et al., Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 2001. 89(1): p. E1-7.
34. Dimmeler, S., et al., HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*, 2001. 108(3): p. 391-7.
35. Rohde, E., et al., Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells*, 2006. 24(2): p. 357-67.
36. Zhang, S.J., et al., Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout in vitro culture. *Cell Res*, 2006. 16(6): p. 577-84.
37. Rehman, J., et al., Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 2003. 107(8): p. 1164-9.

38. Montesano, R., L. Orci, and P. Vassalli, In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol*, 1983. 97(5 Pt 1): p. 1648-52.
39. Hirschi, K.K., D.A. Ingram, and M.C. Yoder, Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(9): p. 1584-95.
40. Fadini, G.P., et al., Glucose tolerance is negatively associated with circulating progenitor cell levels. *Diabetologia*, 2007. 50(10): p. 2156-63.
41. Oliveras, A., et al., Endothelial progenitor cells are reduced in refractory hypertension. *J Hum Hypertens*, 2008. 22(3): p. 183-90.
42. Rossi, F., et al., HDL cholesterol is a strong determinant of endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic subjects. *Microvasc Res*, 2010. 80(2): p. 274-9.
43. Kondo, T., et al., Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1442-7.
44. Muller-Ehmsen, J., et al., Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *Eur Heart J*, 2008. 29(12): p. 1560-8.
45. Laufs, U., et al., Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 2004. 109(2): p. 220-6.
46. Fadini, G.P., et al., Optimized glycaemic control achieved with add-on basal insulin therapy improves indexes of endothelial damage and regeneration in type 2 diabetic patients with macroangiopathy: a randomized crossover trial comparing detemir versus glargine. *Diabetes Obes Metab*, 2011. 13(8): p. 718-25.
47. Umemura, T., et al., Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. *Am J Hypertens*, 2008. 21(11): p. 1203-9.
48. Maron, D.J., S. Fazio, and M.F. Linton, Current perspectives on statins. *Circulation*, 2000. 101(2): p. 207-13.
49. Lacoste, L., et al., Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation*, 1995. 92(11): p. 3172-7.

50. Bustos, C., et al., HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 32(7): p. 2057-64.
51. Laufs, U. and J.K. Liao, Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem*, 1998. 273(37): p. 24266-71.
52. Krankel, N., et al., Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(4): p. 698-703.
53. Asahara, T., et al., Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999. 85(3): p. 221-8.
54. Shintani, S., et al., Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 2001. 103(23): p. 2776-9.
55. Tilling, L., P. Chowienzyk, and B. Clapp, Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*, 2009. 68(4): p. 484-92.
56. Taghavi, S. and J.C. George, Homing of stem cells to ischemic myocardium. *Am J Transl Res*, 2013. 5(4): p. 404-11.
57. Britten, M.B., et al., Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*, 2003. 108(18): p. 2212-8.
58. Everaert, B.R., et al., Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway. *Int J Cardiol*, 2010. 144(3): p. 350-66.
59. Wang, H., et al., Over-expression of PDGFR-beta promotes PDGF-induced proliferation, migration, and angiogenesis of EPCs through PI3K/Akt signaling pathway. *PLoS One*, 2012. 7(2): p. e30503.
60. Li, W., et al., Silent information regulator 1 (SIRT1) promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(3): p. 2274-87.
61. Methe, H., et al., Matrix embedding alters the immune response against endothelial cells in vitro and in vivo. *Circulation*, 2005. 112(9 Suppl): p. 189-95.
62. Frostegard, J., et al., Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. *Circulation*, 1998. 98(11): p. 1092-8.

63. Triolo, G., et al., IgG anti-endothelial cell antibodies (AECA) in type I diabetes mellitus; induction of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. *Clin Exp Immunol*, 1998. 111(3): p. 491-6.
64. Frostegard, J., Atherosclerosis in patients with autoimmune disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(9): p. 1776-85.
65. Yamashita, H., et al., Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 2003. 91(2): p. 133-6.
66. Methe, H., et al., Enhanced T-helper-1 lymphocyte activation patterns in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(12): p. 1939-45.
67. Llevadot, J., et al., HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, 2001. 108(3): p. 399-405.
68. Vasa, M., et al., Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 2001. 103(24): p. 2885-90.
69. Urbich, C. and S. Dimmeler, Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int*, 2005. 67(5): p. 1672-6.
70. Liu, Y., et al., Beneficial effects of statins on endothelial progenitor cells. *Am J Med Sci*, 2012. 344(3): p. 220-6.
71. Crosby, J.R., et al., Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*, 2000. 87(9): p. 728-30.
72. Kawamoto, A., et al., CD34-positive cells exhibit increased potency and safety for therapeutic neovascularization after myocardial infarction compared with total mononuclear cells. *Circulation*, 2006. 114(20): p. 2163-9.
73. Assmus, B., et al., Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002. 106(24): p. 3009-17.
74. Werner, N., et al., Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 2005. 353(10): p. 999-1007.
75. Sherry, B. and A. Cerami, Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol*, 1988. 107(4): p. 1269-77.

76. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*, 2003. 10(1): p. 45-65.
77. Grisar, J., et al., Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*, 2005. 111(2): p. 204-11.
78. Calza, L., et al., Statin therapy decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha in HIV-infected patients treated with ritonavir-boosted protease inhibitors. *HIV Clin Trials*, 2012. 13(3): p. 153-61.
79. Calza, L., et al., Tenofovir/emtricitabine/efavirenz plus rosuvastatin decrease serum levels of inflammatory markers more than antiretroviral drugs alone in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected patients. *HIV Clin Trials*, 2014. 15(1): p. 1-13.
80. Nicholls, S.J., et al., Effect of two intensive statin regimens on progression of coronary disease. *N Engl J Med*, 2011. 365(22): p. 2078-87.
81. Assmus, B., et al., HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res*, 2003. 92(9): p. 1049-55.
82. George, J., et al., Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(12): p. 2636-41.
83. Silvestre, J.S., et al., Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells in ischemic apolipoprotein E-knockout mice accelerates atherosclerosis without altering plaque composition. *Circulation*, 2003. 108(23): p. 2839-42.
84. Yoon, Y.S., et al., Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation*, 2004. 109(25): p. 3154-7.
85. Sata, M., et al., Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 2002. 8(4): p. 403-9.
86. Methe, H. and E.R. Edelman, Cell-matrix contact prevents recognition and damage of endothelial cells in states of heightened immunity. *Circulation*, 2006. 114(1 Suppl): p. I233-8.
87. Costa, L.F., et al., Proangiogenic stimulation of bone marrow endothelium engages mTOR and is inhibited by simultaneous blockade of mTOR and NF-kappaB. *Blood*, 2006. 107(1): p. 285-92.

88. Zani, B.G., et al., Tissue-engineered endothelial and epithelial implants differentially and synergistically regulate airway repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(19): p. 7046-51.
89. Methe, H., et al., Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14⁺ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(7): p. 1439-45.
90. Werner, N. and G. Nickenig, Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(2): p. 257-66.
91. Neri Serneri, G.G., et al., Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation*, 1997. 95(7): p. 1806-12.
92. Jude, B., et al., Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina. *Circulation*, 1994. 90(4): p. 1662-8.
93. Raemer, P.C., et al., Endothelial progenitor cells possess monocyte-like antigen-presenting and T-cell-co-stimulatory capacity. *Transplantation*, 2009. 87(3): p. 340-9.
94. Wu, Y., et al., Essential role of ICAM-1/CD18 in mediating EPC recruitment, angiogenesis, and repair to the infarcted myocardium. *Circ Res*, 2006. 99(3): p. 315-22.
95. Yoon, C.H., et al., Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(5): p. 1066-72.
96. Bogoslovsky, T., et al., Circulating CD133⁺CD34⁺ progenitor cells inversely correlate with soluble ICAM-1 in early ischemic stroke patients. *J Transl Med*, 2011. 9: p. 145.
97. Leeuwenberg, J.F., et al., E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology*, 1992. 77(4): p. 543-9.
98. Ramana, K.V., A. Bhatnagar, and S.K. Srivastava, Inhibition of aldose reductase attenuates TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Faseb j*, 2004. 18(11): p. 1209-18.
99. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 1991. 251(4995): p. 788-91.

100. Savage, C.O., et al., Human vascular endothelial cells process and present autoantigen to human T cell lines. *Int Immunol*, 1995. 7(3): p. 471-9.
101. von Willebrand, E., et al., Distribution of the major histocompatibility complex antigens in human and rat kidney. *Kidney Int*, 1985. 27(4): p. 616-21.
102. Pober, J.S., et al., Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblast Ia antigens induced by recombinant immune interferon. *Nature*, 1983. 305(5936): p. 726-9.
103. Tellides, G., et al., Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes. *Nature*, 2000. 403(6766): p. 207-11.
104. Walter, D.H., S. Dimmeler, and A.M. Zeiher, Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med*, 2004. 4(4): p. 385-93.
105. Ferencik, M. and Y.S. Chatzizisis, Statins and the coronary plaque calcium "paradox": Insights from non-invasive and invasive imaging. *Atherosclerosis*, 2015.
106. Puri, R., et al., Impact of statins on serial coronary calcification during atheroma progression and regression. *J Am Coll Cardiol*, 2015. 65(13): p. 1273-82.
107. Sen, S., et al., Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)*, 2011. 120(7): p. 263-83.
108. Klomp, M., et al., Three-year clinical follow-up of an unselected patient population treated with the genous endothelial progenitor cell capturing stent. *J Interv Cardiol*, 2011. 24(5): p. 442-9.
109. Klomp, M., et al., One-year clinical outcome in an unselected patient population treated with the Genous endothelial progenitor cell capturing stent. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2011. 77(6): p. 809-17.

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 19.10.2017

Ort, Datum

Lisa Reisinger

Unterschrift Doktorandin/Doktorand